

Au nom d'Allah, le Clément, le Miséricordieux

À son prophète Mouhamed (PSL)

Je

dédie

ce travail

In Memorium

*A mes frères et sœurs Malick , Djibril , Ousmane , Fatou et
Awa DIABANG,*

Reposez en paix. Que la terre vous soit légère.

À mon père

Trouve ici le fruit de tes prières permanentes.

Puisse Dieu te donner une longue vie car nous aurons besoin de tes bénédictions pour le chemin qui nous reste à parcourir.

À ma mère

Ce travail est le fruit de tes sacrifices et prières inlassables. Aucune expression ne pourrait être assez belle pour traduire notre amour, notre admiration et notre profond respect car, ma chère maman, tu as été une femme fidèle, résignée, pieuse, honnête et nous avons nagé dans ta tendresse océanique et protectrice. Puisse Dieu le Tout-Puissant te donner une très longue vie et une belle santé afin que tu puisses récolter tout ce dont tu as semé dans son champ fertile.

À mon grand-frère Malang DIABANG

Depuis l'âge de dix ans, j'ai vécu sous tes ailes protectrices. Tant attentionné, tu es la lumière qui éclaire la famille.

Ta bravoure, ta piété, ton honnêteté, ta modestie, ta discrète bienfaisance et ta dignité sont mes repères.

*Tu m'as soutenu sans relâche. A tes côtés, j'ai trouvé une femme exemplaire avec une gentillesse à la limite du possible. Elle a été une mère pour moi : que dieu puisse te récompenser chère Aïssatou **BADJI**.*

Ce modeste travail est le fruit de ton investissement.

Merci de m'avoir éduqué dans l'amour du bien.

Bonne santé et longue vie à toi.

A ma femme Maimouna DIABANG

Ton amour, ta compréhension et ta patience me vont droit au cœur. Aucune expression ne saurait être belle ni assez forte pour exprimer mon estime et ma considération.

Amoureusement à toi ma chérie.

A mes neveux et nièces

Fatou Bintou, Néné, Moustapha, Awa, Babacar, Ahmed, Yaya et Khadidiatou DIABANG.

Je suis fier de vous et soyez unis à jamais.

A mes frères Bakary, Oumar et Sana DIABANG

Votre soutien et vos conseils ont toujours été un viatique pendant mon cursus.

A tous mes frères et sœurs

Votre amour fraternel était sans limite.

A mes nièces Fatou et Titi DIOUF

Vous avez toujours souhaité ma réussite. A travers ce travail, je vous fais part de ma reconnaissance et de ma considération éternelle.

A mes cothésards

Habib Wilson DIATTA, Malick NDIR, Diadié AÏDARA, Ousmane NIANG, Ramatoulaye GUEYE, Amina DIOP, Mimi NDIAYE et Edwige.

Ce fut un grand plaisir de vous cotoyer.

A mon cher ami et promotionnaire Diogoye SÈNE

*Depuis la deuxième année, tes encouragements ont eu une grande importance dans ma réussite. je ne saurai comment te remercier. Je dédie aussi ce travail à ta femme **Rose NDOUR**, celle que j'ai toujours appelée « ma fleur de beauté ».*

Bon ménage.

A tous mes promotionnaires

Thierno Abdoulaye DIALLO, El Hadji DIOUF, Djiby FAYE, Ngor DIAGNE, Serigne Bamba NDOUR, Ngor SARR, Ngollo SANGARE...

L'évocation de vos noms me rappelle les « 100 pas » au jardin botanique et les nuits presque blanches. Ces moments difficiles mais précieux resteront gravés à jamais dans ma mémoire.

Au Dr Sokhna Diagne NDIAYE

J'ai été frappé par ta rigueur et ton dynamisme. Ta compréhension et ta patience à mon égard me vont droit au cœur.

Puisse ce travail être pour moi l'occasion d'exprimer ma profonde gratitude.

Que le Tout-Puissant te rende grâce.

Au personnel de la pharmacie République

Dr Ami Kâ SANE, Claudia GANDO, Asta SARR DIAGNE, Anta DIAGNE, Sokhna BADJI, Maïmouna SAMBOU et Mame Diarra NDIAYE.

Je vous suis profondément reconnaissant. Votre ouverture et votre gentillesse ont forcé mon admiration.

A Guéte Diallo THIAM, Mayé Thioye GUEYE et Assane FAYE

Vos efforts pour la saisie de ce travail ont été immenses. Profondément à vous.

A mes beaux frères

Khalifa DIABANG, Sanéba DIABANG et sa femme Diallyka

A tous mes amis

Ismaila FALL, Ibarhima SOW, Ismaila MBACKE, Amadou DIOUF, Ousmane DIOUF

A Diéynaba KONATE, Boubacar KONATE, Boubacar DIABANG, Cheikh DIABANG, El Hadji DIOUF, Coura Ndoug, Ibrahima SAMBOU, Youssoupha DIABANG, Boubacar BA, Samba DIOUF.

A tous les ressortissants de DIANNAH

A tous les membres de l'AMEFOK

A tous ceux que nous avons connus et qui ne trouveront pas leurs noms cités.

REMERCIEMENTS

Je voudrais manifester ici toute ma gratitude et ma reconnaissance à l'endroit de tous ceux qui, de près ou de loin m'ont aidé et soutenu.

A Mes parents

*A Mes grand-frères Malang, Bakary, Omar, Diéré et Mamadou
DIABANG*

A Ma femme Maimouna DIABANG

Au Professeur Cheikh Saad-Bouh BOYE

Au Professeur Yérin Mbagnick DIOP

Au Dr Sokhna Diagne NDIAYE

Au personnel de la pharmacie République

A NOS MAITRES ET JUGES

À notre maître et Président de jury

Monsieur le Professeur José Marie AFOUTOU

L'honneur que vous nous faites aujourd'hui, en acceptant de présider cette thèse, est à la dimension de votre sagesse et de votre sens humain.

En vous, nous avons su apprécier une grande ouverture d'esprit et d'éminentes qualités d'enseignant.

Puisse ce travail être pour nous, l'occasion de vous exprimer toute notre reconnaissance.

À notre maître et directeur de thèse

Monsieur le Professeur Cheikh Saad-Bouh BOYE

Votre disponibilité constante, votre rigueur scientifique, votre amour du travail bien fait, ajoutés à votre simplicité et à votre humilité nous ont séduit tout au long de ce travail.

Permettez nous, après ce modeste témoignage, de vous exprimer nos sincères remerciements et profonde gratitude pour avoir accepté spontanément de diriger ce travail.

À notre maître et juge

Monsieur le Maître de Conférence Agrégé Mamadou BADIANE

Nous vous remercions profondément de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail.

Vos qualités intellectuelles et votre sens des relations humaines resteront à jamais gravés dans nos mémoires.

Qu'il nous soit permis de vous témoigner ici notre plus grande admiration.

À notre maître et juge

Monsieur le Maître de Conférence Yérin Mbagnick DIOP

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Votre disponibilité, vos qualités humaines et professionnelles font de vous un exemple pour tous.

Soyez assuré de notre grande estime.

Eternelles reconnaissances.

« Par délibération, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leur auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation »

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Vu

Vu

Le Président de Jury

Le Doyen

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

LE RECTEUR, PRESIDENT DE L'UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

ABREVIATIONS

ATCC : American Type Control Culture

CDC : Centers for Disease Control and Prevention

CMB : Concentration Minimale Bactericide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

E-test : Epsillometer-test

NCCLS : National Committee of Clinical Laboratory Standards

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBP : Penicillin Binding Proteine

PLP : Proteine Liant la Pénicilline

WHONET : World Health Organisation Net Work

INTRODUCTION	1
Première partie : GENERALITES	
I/ GENERALITES SUR LA SENSIBILITE.....	3
I-1 Notion de sensibilité	3
I-2 Méthodes d'étude de la sensibilité	3
I-2-1 Méthode de dilution	4
I-2-1-1 Sur milieu liquide	4
I-2-1-1-1 Macrodilution	4
I-2-1-1-2 Microdilution	5
I-2-1-2 Sur milieu solide	6
I-2-2 Méthode de diffusion ou Antibiogramme standard	6
I-2-3 E-test (Epsillometer-test)	7
I-3 Conditions d'application et limites des techniques d'étude de la sensibilité...	8
I-4 Résultats	9
I-4-1 Expression des résultats	9
I-5-2 Interprétation des résultats	10
I-6 Intérêt de l'étude de la sensibilité	11
II/ GENERALITES SUR L'ASSURANCE QUALITE	13
II-1 Historique	13
II-2 Concept de l'assurance qualité	14
II-2-1 Définition de la qualité	14
II-2-2 Concept de l'assurance qualité	16
II-3 Mise en place du système qualité	17
II-4 Types d'assurance qualité	19
II-4-1 Assurance qualité interne	19
II- 4-2 Assurance qualité externe	20

Deuxième partie : TRAVAIL PERSONNEL

I/ MATERIEL	21
I-1 Cadre d'étude	21
I-2 Matériel	21
II/ METHODOLOGIE	22
II-1 Contrôle interne de la qualité de la sensibilité	22
II-1-1 Organisation du laboratoire	22
II-1-1-1 Exigences	22
II-1-1-2 Manuel qualité du laboratoire	23
II-1-2 Entretien du matériel	23
II-1-3 Validation des résultats des études de sensibilité :	
utilisation des souches de référence	25
II-1-3-1 Définition des souches de référence	25
II-1-3-2 Obtention	25
II-1-3-3 Conservation	25
II-1-3-4 Régénération	25
II-1-3-5 Utilisation	27
II-1-4 Contrôle de la qualité des milieux de culture	31
II-1-4-1 Préparation	31
II-1-4-2 Contrôle de la qualité	32
II-1-4-2-1 Contrôle de la profondeur	32
II-1-4-2-2 Contrôle du pH	32
II-1-4-2-3 Contrôle de la stérilité	32
II-1-4-2-4 Contrôle de l'efficacité	33
II-1-4-3 Conservation des milieux préparés.....	33
II-1-5 Contrôle de la qualité de l'inoculum	34
II-1-6 Autres contrôles	34
II-1-7 Documentation	36

II-1-8 Audit	37
II-2 Contrôle externe de la qualité de la sensibilité	37
II-2-1 Souches testées.....	38
II-2-2 Profil de sensibilité aux antibiotiques.....	38
II-2-3 Recherche de bêta-lactamase.....	42
II-2-4 Références utilisées pour les valeurs critiques.....	42
III/ RESULTATS	43
III-1 Contrôle interne de la qualité de la sensibilité.....	43
III-1-1 Résultats des contrôles effectués.....	43
III-1-2 Figures résultant des contrôles de qualité.....	44
III-2 Contrôle externe de la qualité de la sensibilité.....	45
III-2-1 Souches testées.....	45
III-2-2 Profil de sensibilité aux antibiotiques.....	45
III-2-3 Recherche de bêta-lactamase.....	52
IV/ DISCUSSION	53
IV-1 Contrôle interne de la qualité de la sensibilité.....	53
IV-1-1 E-test.....	53
IV-1-2 Les souches de référence	55
IV-2 Contrôle externe.....	57
IV-2-1 Méthodes utilisées.....	57
IV-2-2 Profil de sensibilité aux antibiotiques.....	58
CONCLUSION	63
BIBLIOGRAPHIE	67

Pour une majorité de bactéries responsables de pathologies infectieuses ou de surinfections, il est hasardeux, voir impossible aujourd'hui, de connaître à priori les antibiotiques auxquels une espèce sera systématiquement sensible. L'utilisation rationnelle des antibiotiques en clinique humaine passe donc par la réalisation in vitro de techniques particulières d'étude de la souche bactérienne incriminée face aux différentes molécules antibiotiques. Cependant le nombre important de paramètres entrant dans la réalisation de ces techniques impose des vérifications périodiques. Pour cela, le bactériologiste dispose de souches de référence délivrées par des organismes spécialisés.

Il existe ainsi plusieurs facteurs qui peuvent affecter les résultats des tests de sensibilité et les méthodes standardisées sont probablement plus reproductibles que les méthodes non standardisées. L'assurance qualité est le processus global par lequel la qualité peut être garantie. Une grande partie de ce processus est constituée par le contrôle interne de la qualité qui, passant par le test des souches de référence, est couramment utilisé pour surveiller la reproductibilité et l'exactitude des tests. Cependant, il existe des aspects supplémentaires qui contribuent à l'assurance qualité, incluant surtout la participation à des systèmes d'évaluation externe de la qualité dans laquelle des résultats discordants peuvent être détectés.

C'est dans ce cadre que notre travail a eu comme objet l'utilisation, in vitro, des souches de référence bactériennes dans le contrôle interne de la qualité de la sensibilité aux antibiotiques. Ce travail a porté sur une année de contrôle pour rendre compte de la validité des résultats obtenus par la technique du E-test qui a été utilisée dans le cadre de notre étude.

Dans un deuxième temps, notre travail a porté sur l'intérêt de la participation à un système d'évaluation externe de la qualité de la sensibilité aux antibiotiques qui est un aspect complémentaire au contrôle interne.

I/ GENERALITES SUR LA SENSIBILITE

I-1 NOTION DE SENSIBILITE

En bactériologie médicale, les antibiotiques sont des composés chimiques, élaborés par un micro-organisme ou produits par synthèse et dont l'activité spécifique se manifeste à dose faible sur les micro-organismes. Ces micro-organismes sont dits sensibles [4, 39, 42].

Une bactérie est dite sensible à un antibiotique si elle fait partie de son spectre d'activité, c'est à dire l'éventail d'espèces bactériennes susceptibles d'être inhibées par des concentrations de cet antibiotique (surtout in vivo après utilisation d'une posologie standard). La sensibilité d'une bactérie est connue après détermination de sa concentration minimale inhibitrice (CMI). Celle-ci est obtenue par la mise en œuvre de certaines techniques classiques [3, 4, 5, 41].

Le corollaire du spectre d'activité est la résistance naturelle des bactéries aux antibiotiques. La résistance naturelle est un caractère d'espèce, elle touche toutes les souches d'une espèce bactérienne donnée. Mais dans la réalité, la situation est beaucoup plus complexe car les bactéries peuvent acquérir une résistance aux antibiotiques par modification de leur capital génétique [4, 41, 43].

I-2 METHODES D'ETUDE DE LA SENSIBILITE [3, 4, 5, 12, 14, 18, 27, 28]

L'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques est toujours d'actualité et une nécessité quotidienne pour tout prescripteur d'antibiotiques, qui est obligé d'y recourir en permanence. Elle comporte en priorité une évaluation de l'effet bactériostatique des antibiotiques par la détermination de la CMI.

Par définition, la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée.

L'antibiogramme est la technique classique la plus simple de sa mise en évidence.

Plusieurs méthodes concourent à sa réalisation :

- Méthodes de dilution (sur milieu liquide et sur milieu solide),
- Méthode de diffusion ou antibiogramme standard,
- E-test (Epsillometer-test).

I-2-1 Méthodes de dilution

I-2-1-1 Sur milieu liquide

I-2-1-1-1 Macrodilution [4, 5, 17, 18, 41]

❖ Principe

La méthode de dilution sur milieu liquide ou macrodilution consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotique selon une progression géométrique de raison 2.

❖ Lecture

La lecture se fait au bout du temps d'incubation. La CMI est indiquée par le tube qui contient la plus faible concentration d'antibiotique et où aucune croissance bactérienne n'est visible.

La CMI de la souche de référence est lue en premier lieu pour attester la validité des résultats.

I-2-1-1-2 Microdilution [13, 21, 22]

Dans la perspective de mise au point de techniques directement applicables en routine, le laboratoire initie une nouvelle méthode manuelle de l'antibiogramme utilisant les concentrations critiques en microplaque.

❖ Principe

Une bactérie attaquant le glucose est incubée en présence d'une ou de deux concentrations critiques d'un antibiotique donné. Après 18 heures la croissance est décelée et traduite grâce à un indicateur coloré, le rouge de phénol.

❖ Lecture

Le virage ou non de l'indicateur coloré est apprécié.

Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus par la méthode de E-test qui est la méthode de référence. Cette comparaison permettra de vérifier la validité des résultats obtenus avec la microméthode.[13].

I-2-1-2 Sur milieu solide

❖ Principe

C'est le même principe que sur milieu liquide : mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotique selon une progression géométrique de raison 2 [4, 5, 19, 41].

Cette méthode, utilisant un milieu solide (gélose), offre la possibilité d'étudier simultanément plusieurs types de bactéries par rapport à un antibiotique [12].

❖ Lecture

Après avoir lu la CMI de la souche de référence, celle de la souche à tester est déterminée en partant de la boîte contenant la plus faible concentration de l'antibiotique vers la boîte contenant la plus grande concentration. La CMI est donnée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique [41].

I-2-2 Méthode de diffusion ou antibiogramme standard

❖ Principe

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé (qui est généralement le milieu Mueller-Hinton) préalablement ensemencé avec une suspension de bactéries en phase exponentielle de croissance.

L'antibiotique diffuse dans toutes les directions et il se forme un gradient de concentration à partir de la source (disque). Après incubation, on constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne dont le diamètre est plus ou moins large [3, 4, 5, 12, 14, 17, 19, 39, 41].

❖ Lecture

Après incubation, les diamètres d'inhibition autour des disques des souches de référence et des souches à tester sont respectivement mesurés à l'aide d'une règle à coulisse [4, 19, 39, 41].

I-2-3 E-test (Epsillometer-test)

❖ Principe

Le E-test permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient de concentrations exponentiel continu de l'antibiotique à tester.

Les bandelettes (supports inertes, hydrophobes, de 5mm de large et de 50mm de long) sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec un inoculum de la souche à étudier [12, 28, 41].

❖ Lecture

Les boîtes sont lues à condition d'avoir une ellipse d'inhibition clairement visible. La CMI est lue au point d'intersection de l'ellipse et de la bandelette, celle de la souche de référence est lue en premier lieu [28].

I-3 CONDITIONS D'APPLICATION ET LIMITES DES TECHNIQUES D'ETUDE DE LA SENSIBILITE

- conditions d'application

La réalisation d'un antibiogramme est soumise au respect de conditions techniques qui sont parfois incomplètement et insuffisamment respectées.

Un antibiotique doit obligatoirement être effectué sur une culture pure et identifiée. Cette dernière condition permet d'ajuster la densité de l'inoculum, de choisir judicieusement les antibiotiques à tester et de pratiquer une lecture interprétative.

Un antibiogramme réalisé de manière non standardisée et sur un mélange de germes non identifiés est dépourvu de sens.

- Limites

La méthode de dilution en milieu liquide est moins précise, tandis que celle en milieu solide, ne peut s'appliquer qu'aux bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives à croissance rapide, et de plus, sa réalisation est lourde. L'antibiogramme standard est limitée par la mauvaise diffusibilité en gélose de certains antibiotiques comme les polypeptides. En outre le problème de la stabilité de la charge antibiotique des disques du groupe des bêta-lactamines rend parfois difficile l'interprétation de certains diamètres d'inhibition.

I-4 RESULTATS

I-4-1 Expression des résultats

- Dilution sur milieu liquide : la CMI est indiquée par le tube où aucune croissance n'est visible (**figure 1**).
- Dilution sur milieu solide : la CMI est donnée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique (**figure 2**).
- Antibiogramme standard : à la limite des diamètres d'inhibition (**figure 3**), il existe dans la gélose des concentrations d'antibiotiques égales aux CMI. La mesure des diamètres ne permet pas de chiffrer directement les valeurs des CMI. Toutefois, il existe une relation simple entre ces diamètres et les \log_2 des CMI permettant de tracer la courbe de concordance ou courbe de régression (**figure 4**).

En pratique les laboratoires disposent des bandelettes de lecture sur lesquelles sont reportés les diamètres correspondant aux concentrations critiques.

- E-test : la CMI est donnée par le point d'intersection de l'ellipse et de la bandelette (**figure 5**).

La CMI s'exprime quantitativement en $\mu\text{g/ml}$ et le diamètre en millimètre (mm).

I-4-2 Interprétation des résultats [4, 5]

L'interprétation des résultats est réalisée par rapport aux valeurs critiques après validation des résultats par les souches de référence. Les valeurs critiques sont des concentrations (CMI) ou des diamètres (Antibiogramme standard) qui délimitent les trois catégories définies : «Sensible, Intermédiaire, Résistant».

Les valeurs critiques sont soit établies par un comité local comme pour la France (le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - **CASFM**) soit adaptées aux normes américaines (**NCCLS**).

Ces valeurs sont remises à jour et publiées chaque année (...). Ainsi sont définies une concentration critique inférieure, CCI ou *c*, que l'on peut assimiler à la concentration sérique minimale de l'antibiogramme lors d'un traitement aux doses habituelles chez l'adulte et une concentration critique supérieure, CCS ou *C*, qui correspond à la concentration maximale ne donnant pas lieu à un effet toxique.

Trois zones sont définies par rapport à la CMI :

- Si la **CMI** \leq *c*, la souche est dite **sensible (S)**, sa croissance est inhibée par la concentration sérique obtenue au cours d'un traitement à dose habituelle par voie générale.
- Si la **CMI** $>$ *C*, la souche est dite **résistante (R)**, la concentration sérique ne pouvant atteindre la CMI dans les conditions du traitement, sauf à utiliser des posologies toxiques.
- Si *c* $<$ **CMI** \leq *C*, la souche est dite de sensibilité **intermédiaire (I)** : dans ce cas, le succès thérapeutique est imprévisible.

On définit les mêmes catégories à partir des diamètres d'inhibition mesurés lors de la réalisation de l'antibiogramme standard.

- Si le **diamètre** \geq **D** (limite supérieure), la souche est **S**.
- Si le **diamètre** $<$ **d** (limite inférieure), la souche est **R**.
- Si **d** \leq **diamètre** $<$ **D**, la souche est **I**.

Dans le cas de la microdilution sur milieu liquide, «plusieurs cas peuvent se présenter pour chaque antibiotique :

- ✓ Bactérie sensible : absence de virage dans les 2 cupules (CCS et CCI rouges),
- ✓ Bactérie résistante : virage au jaune dans les 2 cupules.
- ✓ Sensibilité intermédiaire : virage seulement au niveau de la CCI, la CCS reste rouge » [13, 21, 22].

I-5 INTERET DE L'ETUDE DE LA SENSIBILITE [5]

Le choix d'un agent antimicrobien pour traiter une infection est basé essentiellement sur son activité contre l'agent pathogène. Par conséquent, l'antibiothérapie dirigée implique de rechercher, de déceler et d'identifier le ou les micro-organismes responsables de l'infection. Des prélèvements microbiologiques dirigés et appropriés, si possible avant l'antibiothérapie, sont nécessaires. La valeur des tests de sensibilité est non seulement de prédire que la bactérie sera sensible au cours du traitement, in vivo, mais aussi de déceler ou d'exclure des mécanismes de résistances constitutifs ou acquis.

Une souche sensible est une souche pour laquelle la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systématique avec la posologie recommandée.

Une souche de sensibilité intermédiaire est une souche pour laquelle le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel la seule valeur de la CMI n'est pas prédictive de succès thérapeutique. Eventuellement une telle souche pourra être inhibée soit par un traitement local soit par un traitement général effectué avec une posologie augmentée soit parce que l'infection siège dans un organe où l'antibiotique est physiologiquement concentré.

Une souche résistante est une souche pour laquelle il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quelque soit le type de traitement.

Remarque :

L'effet bactériostatique d'un antibiotique est suffisant pour traiter une infection car l'inhibition de la multiplication bactérienne permet au système immunitaire de détruire l'agent infectieux. Par contre, dans les cas d'infections graves ou touchant des individus immunodéprimés, le traitement doit être bactéricide. Pour tester le pouvoir bactéricide d'un antibiotique sur la souche isolée il faut déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB).

La CMB se définit comme la plus faible concentration d'antibiotique capable de détruire 99,99% d'un inoculum bactérien (soit 0,01% de survivant).

La CMB est déterminée après une recherche de CMI en milieu liquide (technique de macrodilution). La technique consiste à ensemencer sur milieu gélosé dépourvu d'antibiotique, une quantité définie de tous les tubes ne présentant pas de croissance visible et à dénombrer les bactéries survivantes. Ce nombre est comparé au nombre de bactéries initialement présentes dans l'inoculum [4 , 5, 17, 18, 41].

II/ GENERALITES SUR L'ASSURANCE QUALITE

II-1 HISTORIQUE [11]

La qualité n'est sans doute pas apparue à un moment précis de l'histoire car c'est un élément fondamental du comportement humain, qui s'est plus ou moins développé selon les circonstances. Il est vraisemblable que l'homme a toujours perçu que sa survie et son avenir dépendaient étroitement des caractéristiques des armes de chasse ou des autres appareils agricoles qu'il devait concevoir afin de satisfaire ses besoins vitaux. Cependant, c'est l'époque de l'apparition des industries et des productions en série que se situent les premières approches formelles de la qualité.

Le début du vingtième siècle est marqué par l'organisation scientifique du travail ou taylorisme, qui conduit à la naissance de la notion d'inspection (supervision du travail en vue de déceler les défauts du produit).

Le premier département qualité a été créé en 1920 au sein de l'entreprise **Bell Telephone** (filiale de la Western electric), il comptait parmi ses membres **George D. EDWARDS** qui a séparé la qualité et **Walter SHWHART** qui a introduit des statistiques comme moyen de maîtrise de la qualité.

La seconde guerre mondiale aura un impact considérable sur le développement de la qualité car l'armée américaine n'aura de cesse de rechercher des standards de qualité pour ses armements.

A cet époque apparaît le concept de qualité acceptable qui consiste à définir le minimum de qualité qu'un client doit attendre de la part de son fournisseur.

Le contrôle de la qualité connaît son plein essor après la seconde guerre mondiale avec l'émergence dans de nombreux pays d'associations nationales pour le contrôle de la qualité.

Progressivement l'entreprise prend conscience de la nécessité d'une relation de confiance avec le client utilisateur de ses produits et parallèlement des précisions sont apportées sur la dimension économique de la qualité.

Alors que l'on avait tendance à montrer que la qualité coûtait chère, **Juran** a montré dès 1951 que la prévention organisée pouvait conduire à des retours d'investissements importants.

Ainsi il a distingué des coûts évitables (coûts issus de défaut) et des coûts non évitables (dépenses de prévention).

Le double objectif : fiabilité et maîtrise des coûts a conduit au principe d'assurance qualité qui est apparu en 1960. La notion de qualité totale par rapport au besoin des clients, de l'entreprise et de ses partenaires s'est dégagée à partir de 1970.

En raison de la mondialisation de l'assurance qualité et afin de rationaliser les méthodes d'évaluation, les normes sur le management de la qualité et l'assurance qualité (série ISO 9000) ont été créées en 1987. Les normes ont été reprises en Europe sous la référence NFEN 2900.

II-2 CONCEPT DE L'ASSURANCE QUALITE

II-2-1 Définition de la qualité

Une définition internationale de la qualité, claire et admise par tous, est fournie par la norme ISO 8402 (la norme 8402 forme avec la norme 9000 version 1994 la norme 9000 version 2000) et reprise par l'association française de normalisation (**AFNOR**) sous la référence NFX

50 – 109 : « la qualité est l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou d'un service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire les besoins implicites et explicites d'un client » [1, 9, 16, 20, 29].

C'est aussi « l'aptitude à l'emploi » [20, 26].

L'intérêt de cette définition est de bien poser que la qualité doit être conçue dans le cadre d'une relation client – fournisseur [16].

Les besoins dits explicites sont définis, clairement exprimés et faciles à appréhender, c'est le cas de la qualité commerciale. Ce besoin explicite se traduit par une exigence de rapidité dans l'envoi du résultat et par une recherche de prestations au coût le plus faible possible [11, 16].

Les besoins implicites sont immatériels et pas toujours évidents à percevoir, c'est par exemple la qualité métrologique. Un besoin classique est que les mesures soient justes, c'est à dire qu'elles fournissent une valeur qui reflète correctement le contenu vrai de l'échantillon [11, 16]. Il est vraie que ce besoin est implicite et que le client ne peut généralement pas vérifier si le laboratoire donne un résultat juste. A travers cette exigence de justesse, il apparaît qu'il faut mettre en place des systèmes externes de contrôle assurés [16].

Dans le cadre d'une relation client – fournisseur, on parle de qualité atteinte lorsqu'il y a adéquation entre les besoins et les performances ou caractéristiques du produits ou service [11].

La non-qualité représente l'ensemble des écarts entre la qualité voulue et celle obtenue, constatés sur une production ou une prestation. On emploie ce terme dans un sens plus large : la non-qualité, « contraire » à la qualité [9, 26].

II-2-2 Concept de l'assurance qualité

Par définition, l'assurance qualité est « un ensemble d'activités préétablies et systématiques mises en œuvre dans le cadre du système qualité et démontrées en tant que besoin pour donner la confiance appropriée en ce qu'une entité satisfera aux exigences pour la qualité » [1, 6, 9, 11, 16, 20, 26, 29].

Lorsque l'élaboration d'un produit (ou service) est lancée, il s'agit d'avoir, à tout moment ou du moins à des étapes clés du processus de conception et réalisation, la « confiance appropriée », sinon la certitude absolue, en ce que le produit (ou service), une fois réalisé, aura bien toutes les caractéristiques voulues lui conférant l'aptitude à l'emploi prévu [9].

Dans les normes ISO 9000 on trouve cinq notions de base qui permettent de comprendre comment construire la qualité. Elle se résume ainsi : la politique qualité, la gestion de la qualité, le système qualité, la maîtrise de la qualité et l'assurance de la qualité [16].

La politique qualité définit les orientations et les objectifs généraux d'une entreprise, en ce qui concerne la qualité et tels qu'ils sont exprimés formellement par la direction générale. C'est la profession de foi de la direction générale, quant à son engagement pour mettre en place la qualité. Elle se traduit par un exposé en termes d'objectifs et de moyens. Concrètement la direction du laboratoire décide explicitement qu'un système d'assurance de la qualité sera mis en place et que les moyens financiers et humains seront dédiés à cet objectif.

La gestion de la qualité n'est qu'un aspect de la fonction générale de gestion qui détermine la politique qualité et la met en œuvre. C'est le point de départ d'un nouveau processus de gestion de l'entreprise. [... Elle] comporte une planification stratégique, l'allocation des ressources en vue de la qualité [...] et les évaluations relatives à la qualité.

Le système qualité est l'ensemble de la structure organisationnelle, des responsabilités, des procédures et des ressources pour mettre en œuvre la gestion de la qualité. Elle regroupe les moyens pratiques et concrets de gestion de la qualité.

La maîtrise de la qualité est l'ensemble des techniques et activités à caractère opérationnel utilisées en vue de répondre aux exigences relatives à la qualité, c'est à dire la vérification de la conformité aux besoins, la prévention des dérivées éventuelles, la recherche de l'excellence, la mesure et la responsabilité.

L'assurance de la qualité regroupe finalement les actions préétablies et systématiquement nécessaires pour donner la confiance appropriée en ce qu'un produit ou un service satisfera aux exigences données relatives à la qualité. Pour atteindre cet objectif, on procède à des évaluations permanentes des facteurs qui influent sur l'adéquation aux applications sous la forme d'audits.

Un audit est une opération d'évaluation documentée, faite par une personne qualifiée, mandatée pour cela et qui devra produire un rapport.

II-3 MISE EN PLACE DU SYSTEME QUALITE

Selon le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale, «tout laboratoire réalisant des analyses de biologie médicale doit disposer d'un système d'assurance de qualité basé sur des procédures opératoires écrites concernant les différentes étapes de l'analyse et les conditions de son exécution . Un système d'assurance de qualité doit être permanent et prévoit une trace des contrôles effectués. Sans cette trace, il est difficile, et parfois impossible, de retrouver une erreur et/ou d'en analyser les causes pour en éviter la répétition. Le système d'assurance de

qualité du laboratoire est placé sous la responsabilité du biologiste ... »[23].

Le système qualité précise comment est organisée la cellule d'assurance qualité, quelles ressources lui sont affectées, quels procédés ou méthodes sont employées et selon quelles procédures le travail est réalisé. Le système qualité va se traduire par l'ensemble d'activités telles que :

- la rédaction d'un manuel qualité qui est un document énonçant les dispositions générales prises par le laboratoire pour obtenir la qualité de ses services,
- la préparation des plans ou procédures qualité qui est un document énonçant les modes opératoires, les ressources et la séquence des activités liées à la qualité, préparé par référence au manuel qualité,
- la mise à jour des moyens de maîtrise de la qualité,
- les procédures de contrôle et la documentation applicable,
- enfin la préparation des enregistrements à la qualité [16].

Quelque soit le référentiel choisi, il est impératif de respecter un certain nombre de règles pour mettre en place, de manière cohérente et efficace, un système d'assurance qualité au laboratoire. Il faut pour cela :

- une grande responsabilité de la direction,
- un système qualité établi à plusieurs niveaux,
- une maîtrise des documents,
- une maîtrise des processus,
- des actions correctives ou préventives,
- un audit de qualité interne,
- une formation du personnel [38].

Tout système qualité qui satisfait aux exigences d'un référentiel doit être certifié. La certification signifie que le système qualité évalué a été reconnu comme répondant aux critères d'efficacité énoncés par la norme de référence [11].

II-4 TYPES D'ASSURANCE QUALITE

L'assurance de la qualité est la somme de toutes les activités dans lesquelles le laboratoire est engagé pour faire en sorte que les résultats soient de bonne qualité [...].

Il existe deux types d'assurance de la qualité : l'assurance interne et l'assurance externe de la qualité [46].

II-4-1 Assurance interne de la qualité

L'assurance interne de la qualité est appelée contrôle de la qualité. Cela signifie que chaque laboratoire a un programme de vérification de la qualité de ses propres tests [46]. Ce programme repose sur la mise en place d'un système d'assurance de la qualité qui, essentiellement, peut se schématiser en trois points :

- il faut mobiliser tous les moyens et procédures pour atteindre la qualité,
- puis, il faut mettre en œuvre les moyens et définir les procédures pour maintenir la qualité,
- enfin, toutes ces opérations doivent être documentées et les documents doivent être gérés et archivés pour apporter les preuves que le travail a été effectivement réalisé [16].

En microbiologie, les critères de la qualité interne sont synonymes d'intérêt clinique, de fiabilité, de reproductibilité et d'efficacité (sensibilité et spécificité) [16].

II-4-2 Assurance externe de la qualité

L'assurance externe de la qualité est appelée évaluation de la qualité. Cela signifie que les résultats du laboratoire sont contrôlés par un organisme extérieur [46].

I/ MATERIEL

I-1 CADRE D'ETUDE

C'est le laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide Le Dantec (H.A.L.D) de Dakar.

Le bâtiment qui abrite les études bactériologiques est divisé en plusieurs salles servant :

- de petites unités de recherche ;
- d'une salle de réception rattachée à une salle de prélèvement ;
- d'une salle de stérilisation ;
- d'une grande salle de réunion ;
- d'un laboratoire proprement dit où sont effectuées les analyses de routine.

I-2 MATERIEL

Il est particulièrement important de bien entretenir le matériel de laboratoire. On ne peut effectuer des tests de bonne qualité si le matériel utilisé est de mauvaise qualité ou mal entretenu [46].

Entre autres non moins importants, les principaux appareils utilisés sont :

- Autoclave
- Bain-marie
- Centrifugeuse
- Etuve
- Four pasteur pour la stérilisation de la verrerie
- Jarre à anaérobies
- Microscope
- Réfrigérateurs [6].

II/ METHODOLOGIE

Les procédures de contrôle de la sensibilité aux antibiotiques sont énoncées par le système qualité mis en place par le laboratoire de bactériologie. En général le « système qualité précise comment est organisée la cellule d'assurance qualité, quelles ressources lui sont affectées, quels procédés ou méthodes sont employées et selon quelles procédures le travail est réalisé » [23]. En outre, il précise que « toutes ces opérations doivent être documentées et les documents doivent être gérés et archivés pour apporter les preuves que le travail a été effectivement réalisé » [16]. On parle ainsi de **contrôle interne** de la qualité de la sensibilité. Cependant, le contrôle interne de la sensibilité doit être évalué. « Cela signifie que les résultats du laboratoire sont contrôlés par un organisme extérieur [46]. On parle de **contrôle externe** de la qualité.

II-1 CONTROLE INTERNE DE LA QUALITE

II-1-1 Organisation du laboratoire

II-1-1-1 Exigences

Un programme de contrôle interne de la qualité doit être :

- pratique ;
- réaliste ;
- économique [6, 46].

Tout contrôle interne de la qualité commence par l'examen du fonctionnement correct du laboratoire.

II-1-1-2 Manuel qualité du laboratoire

La rédaction d'un manuel qualité est l'une des phases du système qualité. C'est un document qui énonce « les dispositions générales prises par le laboratoire pour obtenir la qualité de ses services » [23].

II-1-2 Entretien du matériel

On ne peut effectuer des tests de bonne qualité si le matériel utilisé est de mauvaise qualité ou mal entretenu [46].

Le tableau I montre le calendrier d'entretien courant des principaux appareils.

Tableau I : Contrôle de la qualité du matériel

Matériel	Entretien courant	Surveillance	Entretien technique et inspection
autoclave	Nettoyer et changer l'eau une fois par mois	Vérifier et ajuster le niveau d'eau après chaque opération Noter la durée et la température ou la pression pour chaque opération Noter les résultats des indicateurs biologiques de stérilisation (spores) une fois par semaine	Tous les 6 mois
Bain-marie	Essuyer les parois intérieures et changer l'eau une fois par mois	Vérifier le niveau d'eau chaque jour Noter la température au début de chaque semaine Valeurs admises : 54 -57°C	Tous les 6 mois
Centrifugeuse	Essuyer les parois intérieures avec une solution antiseptique une fois par semaine, ou chaque fois que des tubes de verre sont cassés ou renversés		Remplacer les balais une fois par an
Etuve	Nettoyer les parois intérieures et les rayonnages une fois par mois	Noter la température au début de chaque journée de travail (valeurs admises : 35 ± 2°C)	Tous les 6 mois
Four pasteur pour la stérilisation de la verrerie	Nettoyer l'intérieur une fois par mois	Noter la durée et la température de chaque opération	Tous les 6 mois
Jarre	Nettoyer l'intérieur de la jarre une fois par semaines. Réactiver le catalyseur après chaque opération (160°, 2h) Remplacer le catalyseur tous les 3 mois	Utiliser une bandelette réactive au bleu de méthylène à chaque opération Noter une fois par semaine le virage de l'indicateur	Inspecter le joint d'étanchéité du couvercle une fois par semaine
Microscope	Essuyer les objectifs et les oculaires avec du papier absorbant ou du papier de nettoyage optique à la fin de chaque journée de travail Nettoyer et lubrifier le chariot une fois par semaine Recouvrir le microscope de sa housse lorsqu'il n'est pas utilisé	Vérifier l'alignement du condensateur une fois par mois	Une fois par an
Réfrigérateur	Le nettoyer et le dégeler tous les 2 mois et après chaque coupure de courant	Noter sa température au début de chaque semaine (valeur admises : 2 - 8°C)	Tous les 6 mois

Leurs températures de fonctionnement peuvent être enregistrées (...) : procéder à une lecture quotidienne et vérifier si l'indication de température est acceptable. Si elle est aberrante, noter la.

II-1-3 Validation des résultats des études de sensibilité : utilisation des souches de référence

II-1-3-1 Définition des souches de référence

Les souches de référence bactériennes sont des souches qui possèdent tous les caractères d'un groupe de bactéries et qui sont génétiquement stables.

II-1-3-2 Obtention des souches de référence

Les souches de référence recommandées pour les tests de sensibilité sont fournies par le National Collection of Type Cultures (NCTC, London, UK), l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) ou sous des formats variés de sources commerciales [8].

Elles sont aussi recommandées par les fabricants tels que AB Biodisk (Sölna, Sweden) [28].

II-1-3-3 Conservation des souches de référence

Ces souches sont originellement conservées dans le freezer à -70°C et devront être régénérées avant utilisation [8, 28].

II-1-3-4 Régénération des souches de référence

- Lire la notice de la souche fournie par le fabricant ; celle-ci doit être

considérée comme spécifique de la souche donnée.

- Réunir tous les matériels et réactifs nécessaires avant la manipulation ;
s'assurer que la chaîne ne sera pas interrompue jusqu'à la conservation.
- Régénérer la souche selon les recommandations dans la notice en utilisant les réactifs, milieux et matériels cités et en respectant les conditions d'incubation (température, temps d'incubation qui est à prolonger en cas de pousse insuffisante ou nulle, atmosphère, etc.)
- Valider la souche :
 - L'identifier avec une galerie complète ou minimale pour les germes difficiles ou à identification longue ;
 - Vérifier le profil de la souche en le testant avec les antibiotiques (...) pour lesquels elle est choisie comme contrôle, pour le comparer avec les caractères qu'on attend d'elle ;
 - Reporter les résultats sur une fiche d'enregistrement à classer.
- Repiquer la souche en gélose inclinée à partir de la primoculture et incubé dans les conditions requises.
- Conserver à -70°C dans trois cryotubes sur des portoirs différents rangés

si possible dans deux congélateurs différents ; un portoir servira de stock permanent et au moins un, de stock de travail.

- Repiquer sur milieu solide en boîte le plus souvent à chaque sortie à – 70°C, en grattant à la surface du cryotube sans décongeler complètement (ou en décongelant rapidement à 37°C, en agitation douce au bain-marie et en recongelant le plus rapidement possible après ensemencement).
- Valider la souche par identification minimale en même temps que les tests de contrôle des produits à effectuer.
- Enregistrer les résultats d'identification et des tests de contrôle dans une fiche à classer.
- Revenir toujours en cryotube d'origine en cas de validation fautive de la souche. Si le problème persiste après avoir vérifié toutes les autres étapes des tests, changer de cryotube.

II-1-3-5 Utilisation des souches de référence

La validation des résultats passe par l'utilisation des souches de référence (...) [2, 8, 28, 44, 45] dont les valeurs des CMI pour les antibiotiques testés sont connues (Normes NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory

Standards) [28]. Il faut auparavant lire les valeurs des CMI des souches de référence et comparer les résultats avec les normes NCCLS. Il en est de même pour l'antibiogramme standard.

Le développement des paramètres de contrôle de qualité en testant les souches de référence quotidiennement, a été un facteur important dans le haut niveau de performance atteint par plusieurs laboratoires dans les tests de sensibilité aux antibiotiques. Cependant, à cause du coût de qualité quotidien et du haut niveau de performance de plusieurs laboratoires, les tests de contrôle de qualité se font maintenant plus par semaine que par jour. Le NCCLS a publié un guide pour changer la fréquence du contrôle de qualité du jour à la semaine [6, 8]. La fréquence peut être aussi mensuelle.

Le test est validé lorsqu'il y a une correspondance et indique que la manipulation a respecté toutes les conditions [28] et aussi lorsque la reproductibilité, la répétabilité, l'efficacité, la sensibilité et la spécificité ont été totales avec ces souches de référence.

Les résultats des souches testées peuvent alors être lus (...) [28].

Nous avons utilisé la méthode du E-test pour réaliser la validation des résultats. Ainsi elle nous a permis d'effectuer le contrôle de qualité à l'aide de souches de référence vis à vis de certains antibiotiques. Le contrôle a été fait mensuellement sur une période d'une année.

* **Tableau II** : Souches de référence et antibiotiques testés

Souches de Référence	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
Antibiotiques		

Amoxicilline /Acide clavulanique		
Cefotaxine		
Ticarcilline /Acide clavulanique		

* E-test

✓ Matériels utilisés

Nous avons utilisé le matériel suivant :

- Applicateurs
- Cassettes pour la sélection d'antibiotiques
- Bandes adhésives
- Dessicateurs
- Tubes de stockage
- Ecouvillons stériles (coton cardé + baguettes en bois)
- Pincés
- Echelles Mac Farland
- Bandes E-test
- Boites de pétri de 90 ou 150mm de diamètre
- Guide de lecture
- Nouvelles normes NCCLS
- pHmètre
- Milieu Mueller Hinton

✓ Principe

Le E-test permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation des bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de l'antibiotique à tester. Ce gradient couvre une zone qui, en fonction des molécules, va de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32 mg/l. Le E-test associe les caractéristiques des méthodes de diffusion et de dilution en milieu solide. Les bandelettes (supports inertes, hydrophobes, de 5 mm de largeur et de 50 mm de longueur) sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec un inoculum de la souche à étudier. Après incubation, l'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse d'inhibition dont les points d'intersection avec la bandelette, permet une interprétation rapide.

✓ Technique

- Préparer le milieu.
- Préparer l'inoculum de la souche de référence et ajuster sa turbidité à l'échelle Mac Farland.
- Ensemencer la gélose à l'aide d'un écouvillon.
- Préparer les bandelettes d'antibiotiques.
- Appliquer les bandes en s'assurant avant tout que la surface de la gélose est bien séchée. Une fois la bande déposée (après s'être assuré que la face graduée de la bande est bien celle en contact avec le côté adhésif de l'applicateur), elle ne doit plus être déplacée pour éviter de gêner la diffusion immédiate de l'antibiotique.
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- Lire les CMI : les boîtes sont lues après la période d'incubation recommandée, à condition d'avoir une croissance significative à la

surface de la gélose et que l'ellipse d'inhibition soit clairement visible. La CMI est lue au point d'intersection de l'ellipse et de la bande.

La lecture ne présente pas de difficulté lorsque la zone d'inhibition est parfaitement définie et symétrique. Dans les autres cas, une interprétation est nécessaire :

- l'observation d'un décrochage du « **dip** » dans la zone de lecture impose de lire la CMI en extrapolant la courbe de l'ellipse.
- la présence de colonies « squatter » doit être analysée ; il peut s'agir d'une résistance hétérogène, de l'émergence de mutants résistants ou de mélanges bactériens.
- l'existence d'une hémolyse sur gélose au sang peut rendre délicate l'estimation de CMI et ne doit pas interférer avec la lecture.
- la présence d'une croissance bactérienne en ligne le long de la bandelette n'a pas de signification bactériologique et est certainement due à une gélose insuffisamment séchée avant le dépôt de la bandelette.
- les points d'intersection sur la bandelette peuvent être asymétriques ; la CMI correspond à la concentration la plus haute lue sur la règle.

Quelle que soit la méthode utilisée, les contrôles de qualité sur les milieux de culture et l'inoculum doivent être obligatoirement effectués.

D'autres contrôles spécifiques à chaque méthode sont aussi obligatoires.

II-4-1 Contrôle de la qualité des milieux de culture

II-4-1-1 Préparation

Les milieux de culture peuvent être préparés au laboratoire à partir des constituants de base, de poudres déshydratées disponibles dans le commerce ou peuvent être achetés prêts à l'emploi. On recommande les poudres déshydratées que l'on trouve dans le commerce parce qu'elles sont non seulement économiques du point de vue transport et conservation, mais aussi de meilleure qualité que les milieux préparés au laboratoire [6, 46]. Pour que les milieux préparés au laboratoire soient de bonne qualité il faut :

- suivre scrupuleusement les instructions du fabricant pour la préparation,
- préparer une quantité de milieu qui sera utilisée avant la date limite de conservation.

II-1-4-2 Contrôle de la qualité des milieux

II-1-4-2-1 Contrôle de la profondeur

Le contrôle de la profondeur concerne les méthodes utilisant comme milieu, la gélose. Il faut respecter la profondeur (4mm) de la gélose en coulant le milieu dans les boîtes de pétri [8, 12].

II-1-4-2-2 Contrôle du pH

Le pH d'un milieu préparé n'a pas besoin d'être systématiquement vérifié lorsqu'il est correctement préparé à partir de poudre déshydratée. Si le milieu est préparé à partir des constituants de base, il faut le laisser refroidir avant de

vérifier son pH. Les milieux solides seront testés à l'aide d'une électrode de surface, ou après macération dans de l'eau distillée.

Si le pH (7,4) s'écarte de plus de 0,2 unité de la norme, on l'ajuste avec un acide ou une base, ou préparer un nouveau lot [6, 46].

II-1-4-2-3 Contrôle de la stérilité

Le contrôle de la stérilité consiste à « pratiquer les épreuves de stérilité habituelles sur les milieux auxquels on a ajouté du sang ou autres éléments après autoclavage : prélever 3 à 5% de chaque lot et incuber à 35°C pendant 2 jours ». Dans le cas de la microdilution, les milieux liquides doivent être contrôlés. Chaque lot de milieu préparé est soumis à un contrôle de stérilité (...). Un millilitre de chaque milieu préparé est déposé dans des tubes à hémolyse stériles qui sont incubés à 37°C pendant 48 heures.

Le milieu est considéré comme stérile en l'absence de trouble et virage de l'indicateur coloré [13, 21, 22].

II-1-4-2-4 Contrôle de l'efficacité

Le laboratoire doit conserver une série de souches de référence pour surveiller l'efficacité du milieu [6, 46]. Pour la microdilution, par exemple, « le milieu estensemencé avec une bactérie (souche de référence) qui consomme le glucose ». Après 18 heures d'incubation à 37°C, le milieu doit normalement subir un virage de sa couleur rouge en jaune [13].

Le milieu préparé doit être aussi reproductif. Chaque fois qu'un milieu a été préparé, des souches de référence ont été testées.

II-1- 4-3 Conservation des milieux préparés

- 1 - les mettre à l'abri de la lumière du soleil.
- 2 - les mettre à l'abri de la chaleur. Les milieux contenant du sang, d'autres additifs organiques, ou des antibiotiques, doivent être conservés au réfrigérateur.
- 3 - La durée de conservation des milieux préparés, lorsqu'ils sont stockés dans un endroit frais et sombre, dépendra du type de récipient utilisé.

Les durées de conservation habituelles sont les suivantes :

- Tubes bouchés avec du coton hydrophile : trois semaines.
- Tubes à bouchons non hermétiques : deux semaines.
- Boîtes de pétri, si elles sont dans des sacs en plastique scellés : quatre semaines [6].

Il faut toujours vérifier la date de péremption des milieux.

II-1-5 Contrôle de la qualité de l'inoculum

La densité de l'inoculum des bactéries est un élément primordial et elle doit être ajustée à l'aide d'un photomètre ou par comparaison avec un étalon d'opacité (échelle de Mac Farland) [8, 18, 19].

En France, l'antibiogramme par diffusion est réalisée avec une suspension contenant environ 10^6 bactéries par millilitre. Pour les méthodes de dilution en milieu gélosé, les spots doivent renfermer environ 10^4 bactéries [19].

II-1-6 Autres contrôles

- Antibiogramme standard

Les antibiotiques ainsi que les disques doivent être standardisés. Cette standardisation est effectuée par les fabricants et le laboratoire a pour unique responsabilité de stocker les disques dans les conditions optimales et de ne pas utiliser des disques périmés [17, 18, 19]. Les stocks de disques peuvent être conservés à 8°C et de préférence à -20°C [8].

Avant utilisation, les disques doivent être amenés à température ambiante. Toute cartouche ouverte doit être utilisée dans les cinq jours [17, 18, 19].

- E-Test

Les bandes E-Test doivent être conservées dans un congélateur à -20°C. Toutes les cartouches non entamées peuvent être stockées à -20°C jusqu'à la date d'expiration. Celles entamées sont rescellées dans des dessiccateurs et conservées toujours à -20°C. Avant usage, les cartouches sont laissées quelques minutes à la température ambiante [12].

Les souches de référence « doivent être conservées correctement par deux méthodes :

- soit en stock de culture pour l'utilisation fréquente à -20°C ;
 - soit à -70°C dans des cryotubes pour une onservation de longue durée »
- [12]

Il faut respecter les conditions de manipulation et la démarche de protocole établi, sélectionner correctement la terminaison en pointe de la CMI et vérifier la profondeur de la gélose, la capacité de croissance supportée et la présence d'antagonistes telles la thymidine, la thymine et les ions.

- Les cultures

Les stocks de culture de toutes souches de référence doivent être obtenus à partir d'une source sûre et maintenue de manière à assurer la viabilité continue avec une opportunité minimale pour la sélection de variants résistants. Les cultures de travail peuvent être maintenues à 4-8°C en gélose trypticase soja avec des repiquages hebdomadaires. Les cultures de travail doivent être remplacées au moins une fois par mois par des cultures congelées, hydrophilisées ou commercialisées ou plutôt si les résultats sont douteux. Les cultures peuvent être maintenues à -20°C au moins (soit dans un congélateur ou dans de l'azote) dans un stabilisateur convenable tel un bouillon avec 15% de glycérol, sang de mouton ou de lapin défibriné ou 50% de sérum de veau fœtal. Les cultures peuvent aussi être maintenues à l'état lyophilisé. Quelle que soit la méthode, les cultures peuvent être stockées sans risque apparent affectant leur sensibilité.

Avant d'être testées, les cultures doivent être transférées dans un bouillon nutritif, incubées pour 4 à 18 heures et isolées ensuite sur boîte gélosée pour obtenir des colonies isolées. Les tests de contrôle doivent être effectués sur des colonies de 18-24 heures et jamais à partir de cultures stockées. Si les résultats des tests de contrôle révèlent une contamination des cultures en stock ou des changements dans leurs profils de sensibilité, des cultures fraîches doivent être obtenues. Un problème semblable peut être suspecté s'il y a un changement dramatique soudain dans les résultats du test, qui ne peut être expliqué par la méthodologie.

Remarque

Tous les contrôles effectués doivent être notés sur des fiches de travail. L'ensemble de ces fiches constitue un document final.

II-1-7 Documentation

Toutes les procédures et résultats doivent être documentés « et les documents doivent être gérés et archivés pour apporter les preuves que le travail a été effectivement réalisé » [16]. Les différentes opérations qui ont permis d'effectuer les contrôles de qualité doivent pouvoir être traçables (...). En effet la traçabilité des résultats exige qu'à tout moment on puisse retrouver les éléments qui ont servi à la production du résultat (...) [16]. En outre « les non-conformités identifiées par le personnel du service doivent être documentées et faire l'objet d'un traitement effectif. En particulier il convient d'en rechercher les causes et de décider d'une action corrective. L'efficacité des actions correctives doit être vérifiée et lorsque des problèmes sont récurrents, des actions préventives doivent être entreprises. Les preuves qu'on a décidé et mené des actions correctives ou préventives puis testé leur efficacité doivent être conservées [38].

II-1-8 Audit de qualité interne

C'est l'examen méthodique et indépendant en vue de déterminer si les activités et résultats relatifs à la qualité satisfont aux dispositions préétablies et si ces dispositions sont mises en œuvre de façon effective et sont aptes à atteindre les objectifs [38].

II-2 CONTROLE EXTERNE DE LA QUALITE DE LA SENSIBILITE

Le contrôle « externe de la qualité est appelée évaluation de la qualité (parfois appelé système d'évaluation des compétences). Cela signifie que les résultats du laboratoire sont contrôlés par un organisme extérieur » [46].

Il existe plusieurs façons d'effectuer le contrôle externe de la qualité de la sensibilité aux antibiotiques. Dans certains systèmes, les isolats bactériens sont

envoyés à un laboratoire de référence central utilisant une méthode de référence standardisée, et les résultats sont recueillis et maintenus par ce laboratoire. Dans d'autres systèmes, la méthode du E-Test est utilisée par les laboratoires participants pour tester localement les isolats et les résultats sont transmis à un laboratoire central. Une troisième approche est de collecter directement les résultats des tests de sensibilité des différents laboratoires à l'aide d'un ordinateur ou à travers des disquettes qui sont envoyées à un laboratoire central utilisant un logiciel standardisé comme le WHONET. Le dernier système consiste à faire participer plusieurs laboratoires à travers le monde. Chaque laboratoire utilise une méthode de routine différente de celles déjà énoncées [43]. Dès que l'on a reçu tous les rapports des laboratoires participants, on leur envoie des réponses correctes (...). Chaque laboratoire a un numéro de code connu de lui seul. Il peut ainsi apprécier ses résultats par rapport aux autres, mais ceux-ci restent anonymes [8, 46].

C'est ce dernier système que nous avons utilisé en collaboration avec Centers for Disease Control and Prevention (CDC) à Atlanta GA30333.

II-2-1 Souches testées

Notre laboratoire a testé cinq souches qui sont codifiées de la façon suivante :

- souche CDC103
- souche CDC104
- souche CDC105
- souche CDC106
- souche CDC107

II-2-2 Profil de sensibilité aux antibiotiques

Les antibiotiques répertoriés dans les tableaux III et IV sont ceux testés en commun avec le laboratoire de Centers for Disease Control and Prevention et les autres laboratoires participants.

Tableau III : Antibiotiques testés et méthodes utilisées pour les souches CDC103, CDC104 et CDC105

Souches	Antibiotiques	Méthodes utilisées
Souche CDC103 Souche CDC104 Souche CDC105	Chloramphénicol	D
	Ciprofloxacine	D
	Clindamycine	D
	Erythromycine	D
	Gentamicine	D
	Oxacilline	D ; E-test
	Penicilline G	D
	Rifampicine	D
	Tétracycline	D
	Vancomycine	E-test

D : Diffusion par la méthode des disques

E-test : Epsillometer test

Tableau IV: Antibiotiques testés et méthodes utilisées pour les souches CDC106 et CDC107

Souches	Antibiotiques	Méthodes utilisées
Souches CDC106 Souches CDC107	Haut niveau gentamicine	D
	Pénicilline G	D
	Haut niveau streptomycine	D
	Tétracycline	D
	Vancomycine	E-test

Diffusion par la méthode des disques

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec la suspension bactérienne. L'antibiotique diffuse dans la gélose, y créant un gradient de concentrations. Après incubation, chaque disque apparaît entouré d'une zone d'inhibition de la croissance appelée diamètre d'inhibition.

Nous avons utilisé le milieu de Mueller-Hinton seul ou supplémenté de 2% de NaCl pour tester l'oxacilline et la pénicilline G avec les souches CDC103, CDC104 et CDC105. Des boîtes de Pétri carrées de 120 mm x 120 mm, contenant une gélose de 4 mm d'épaisseur, ont été utilisées.

Nous avons réalisé une suspension de colonies pour préparer l'inoculum qui a été ajusté à l'échelle 0,5 Mac Farland standard. Après ensemencement du milieu et dépôt des disques imprégnés d'antibiotiques, nous avons incubé à 35°C à l'air libre pendant 24 heures (48 heures pour l'oxacilline et la pénicilline G avec la souche CDC105, pour la gentamicine et la streptomycine avec les souches CDC106 et CDC107). Au bout du temps d'incubation, chaque disque apparaissait entouré d'une zone d'incubation qui a été ensuite mesurée.

E-test

Des bandelettes imprégnées d'antibiotiques sont appliquées sur la surface d'un milieu gélosé (profondeur : 4 mm) préalablement ensemencé avec un inoculum de la souche à étudier. Au bout du temps d'incubation la CMI est lue au point d'intersection de l'ellipse d'incubation et de la bandelette.

Nous avons :

- utilisé le milieu de Mueller Hinton (supplémenté de 2% de NaCl pour tester l'oxacilline),
- réalisé une suspension de colonies (inoculum) ajustée à 0,5 Mac Farland puis ensemencé les boîtes de pétri,
- déposé les bandelettes imprégnées d'antibiotiques,
- incubé à 35°C à l'air libre pendant 24 heures.

L'inhibition de la croissance bactérienne est caractérisée par l'apparition d'une ellipse dont l'intersection avec la bandelette donne la CMI.

Trois zones sont définies par rapport à la CMI :

- ✓ Si la **CMI** \leq **c**, la souche est dite **sensible (S)**, sa croissance est inhibée par la concentration sérique obtenue au cours d'un traitement à dose habituelle par voie générale.
- ✓ Si la **CMI** $>$ **C**, la souche est dite **résistante (R)**, la concentration sérique ne pouvant atteindre la CMI dans les conditions du traitement, sauf à utiliser des posologies toxiques.
- ✓ Si **c** $<$ **CMI** \leq **C**, la souche est dite de sensibilité **intermédiaire (I)** : dans ce cas, le succès thérapeutique est imprévisible.

On définit les mêmes catégories à partir des diamètres d'inhibition mesurés lors de la réalisation de l'antibiogramme standard.

- Si le **diamètre** \geq **D** (limite supérieure), la souche est **S**.
- Si le **diamètre** $<$ **d** (limite inférieure), la souche est **R**.
- Si **d** \leq **diamètre** $<$ **D**, la souche est **I**.

II-2-3 Recherche de Béta-lactamase

La recherche de Béta-lactamase a été faite pour les souches CDC103, CDC104 et CDC105.

II-2-4 Références utilisées pour les valeurs critiques

Les références suivantes ont servi de support d'interprétation :

- Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie
- National Committee for Clinical Laboratory Standards
- Abaque de lecture de l'antibiogramme de PASTEUR, 1996.