

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

★★★★★

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

★★★★★



ANNEE 2001

N° 119

**L'ASSURANCE QUALITE EN MICROBIOLOGIE :
APPLICATIONS DANS LE DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE
DES INFECTIONS RESPIRATOIRES BASSES AIGUËS A DAKAR**

THESE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(DIPLOME D'ETAT)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT

Le 29 Décembre 2001

Par

Mamadou Opa Moussa BOCOUM

Né le 22 Juillet 1972 à Dakar (SENEGAL)

Membres du Jury

PRÉSIDENT :	M.	José	Marie	AFOUTOU	: Professeur
MEMBRES :	M.	Cheikh	Saad-Bouh	BOYE	: Professeur
	M.	Mamadou		BADIANE	: Maître de Conférences Agrégé
	M.	Amadou		DIOUF	: Maître de Conférences Agrégé
DIRECTEUR DE THÈSE :	M.	Cheikh	Saad-Bouh	BOYE	: Professeur

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE
ET D'ODONTOSTOMATOLOGIE



PERSONNEL DE LA FACULTE

DOYEN	M. Doudou	THIAM
PREMIER ASSESSEUR.....	M. Cheikh Saad Bouh	BOYE
DEUXIEME ASSESSEUR.....	M. Malick	SEMBENE
CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS.....	M. Assane	CISSE

I - MEDECINE

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR GRADE POUR L'ANNEE UNIVERSITAIRE

2000-2001

* * *

PROFESSEURS TITULAIRES

* * *

M. José Marie	AFOUTOU	Histologie Embryologie
M. Mamadou	BA	Pédiatrie
M. Mamadou	BA	Urologie
M. Serigne Abdou	BA	Cardiologie
M. Salif	BADIANE	Maladies Infectieuses
M. Fallou	CISSE	Physiologie
M. Moussa Fafa	CISSE	Bactériologie-Virologie
M. Fadel	DIADHIOU	Gynécologie-Obstétrique
M. Baye Assane	DIAGNE	Urologie
M. Lamine	DIAKHATE	Hématologie
+ M. El Hadj Malick	DIOP	O.R.L.
Mme Thérèse	MOREIRA/DIOP	Médecine Interne I
M. Sémour	DIOUF	Cardiologie
M. Souvasin	DIOUF	Orthopédie-Traumatologie
M. Oumar	GAYE	Parasitologie
M. Mamadou	GUEYE	Neuro-Chirurgie
M. Momar	GUEYE	Psychiatrie
M. Serigne Magueye	GUEYE	Urologie
M. Nicolas	KUAKUVI	Pédiatrie
M. Bassirou	NDIAYE	Dermatologie
M. Ibrahima Pierre	NDIAYE	Neurologie
+ M. Madoune Robert	NDIAYE	Ophtalmologie
Mme Mbayang NIANG	NDIAYE	Physiologie
M. Mouhamadou	NDIAYE	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. Mouhamadou Mansour	NDIAYE	Neurologie
M. Papa Amadou	NDIAYE	Ophtalmologie
+ M. Mamadou	NDOYE	Chirurgie Infantile
M. Abibou	SAMB	Bactériologie-Virologie

+ *Professeur Associé* ; & *Personnel en détachement*
Personnel mis en Disponibilité

M Mamadou	SARR	Pédiatrie
& Mme Awa	COLL/SECK	Maladies Infectieuses
M. Seydina Issa Laye	SEYE	Orthopédie-Traumatologie
M. Dédéou	SIMAGA	Chirurgie Générale
M. Abdourahmane	SOW	Médecine Préventive
M. Housseyn Dembel	SOW	Pédiatrie
M. Mamadou Lamine	SOW	Médecine Légale
M. Moussa Lamine	SOW	Anatomie
*M. Cheikh Tidiane	TOURE	Chirurgie Générale
M. Meissa	TOURE	Biochimie Médicale
M. Pape	TOURE	Cancérologie
M. Alassane	WADE	Ophthalmologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

* * *

M. Moussa	BADIANE	Radiologie
M. Seydou Boubakar	BADIANE	Neuro-Chirurgie
M. Mohamed Diawo	BAH	Gynécologie-Obstétrique
M. Jean Marie	DANGOU	Anatomie-Pathologie
M. Abdarahmane	DIA	Anatomie
* M. Massar	DIAGNE	Neurologie
* M. Issakha	DIALLO	Santé Publique
M. Amadou Gallo	DIOP	Neurologie
M. Bernard Marcel	DIOP	Maladies Infectieuses
M. El Hadj Ibrahima	DIOP	Orthopédie-Traumatologie
M. Ibrahima Bara	DIOP	Cardiologie
M. Saïd Norou	DIOP	Médecine Interne II
M. Alassane	DIOUF	Gynécologie-Obstétrique
M. Boucar	DIOUF	Médecine Interne I (Néphrologie)
M. Raymond	DIOUF	O.R.L.
M. Babacar	FALL	Chirurgie Générale
M. Ibrahima	FALL	Chirurgie Pédiatrique
Mme Mame Awa	FAYE	Maladies Infectieuses
M. Oumar	FAYE	Parasitologie
Mme Sylvie SECK	GASSAMA	Biophysique
Mme Gisèle WOTO	GAYE	Anatomie Pathologie
M. Lamine	GUEYE	Physiologie

<i>* Associé</i>	<i>& Personnel en détachement</i>	
M. Abdoul Almamy	HANE	Pneumophtisiologie
*M. Mamadou Mourtalla	KA	Médecine Interne I
M. Abdoul	KANE	Cardiologie
M. Victorino	MENDES	Anatomie Pathologie
M. Jean Charles	MOREAU	Gynécologie
*M. Claude	MOREIRA	Pédiatrie
M. Issa	NDIAYE	O.R.L.
M. Alain Khassim	NDOYE	Urologie
M. Abdoulaye	NDIAYE	Anatomie-Chirurgie
M. El Hadji	NIANG	Radiologie
*M. Youssoupha	SAKHO	Neuro-Chirurgie
M. Niama Diop	SALL	Biochimie Médicale
Mme Bineta	SALL/KA	Anesthésie-Réanimation
M. Mohamadou Guélaye	SALL	Pédiatrie
M. Moustapha	SARR	Cardiologie
M. Birama	SECK	Pédopsychiatrie
M. El Hassane	SIDIBE	Médecine Interne II
M. Ahmed Iyane	SOW	Bactériologie-Virologie
*M. Pape Salif	SOW	Maladies Infectieuses
Mme Haby SIGNATE	SY	Pédiatrie
M. Mouhamadou Habib	SY	Orthopédie-Traumatologie
M. Cheickna	SYLLA	Urologie
M. Omar	SYLLA	Psychiatrie
M. Doudou	THIAM	Hématologie

MAITRES-ASSISTANTS

* * *

M. El Hadj Amadou	BA	Ophtalmologie
M. Moussa	BA	Psychiatrie
M. Momar Codé	BA	Neurochirurgie
Mme Sokhna	BA/DIOP	Radiologie
M. Boubacar	CAMARA	Pédiatrie
M. El Hadj Souleymane	CAMARA	Orthopédie-Traumatologie
M. Cheikh Ahmed T.	CISSE	Gynécologie-Obstétrique
Mme Mariama Safiétou KA	CISSE	Médecine Interne II
M. André Vauvert	DANSOKHO	Orthopédie-Traumatologie

Personnel mis en Disponibilité

* *Associé*

Mme Anta TAL	DIA	Médecine Préventive
* M. Ibrahima	DIAGNE	Pédiatrie
M. Djibril	DIALLO	Gynécologie-Obstétrique
*M. Mame Thierno	DIENG	Dermatologie
M. Yémou	DIENG	Parasitologie
Mme Elisabeth	DIOUF	Anesthésie-réanimation
M. Mamadou Lamine	DIOUF	Médecine Interne I (Gastroentérologie)
M. Saliou	DIOUF	Pédiatrie
M. El Hadji Fary	KA	Médecine Interne
M. Assane	KANE	Dermatologie
*M. Mouhamadou	MBENGUE	Médecine Interne I Orthopédique
Mme Coura SEYE	NDIAYE	Ophthalmologie
M. Ousmane	NDIAYE	Pédiatrie
M. Cheikh Tidiane	NDOUR	Maladies infectieuses
Mme Paule Aida ROTH	NDOYE	Ophthalmologie
M. Ndaraw	NDOYE	Neurochirurgie
M. Abdoulaye	POUYE	Médecine Interne I
Mme Anne-Aurore	SANKHALE/DIOUF	Chirurgie générale
M. Masserigne	SOUMARE	Maladies infectieuses
M. Abdoulaye	SAMB	Physiologie
Mme Anna	SARR	Maladies infectieuses
M. Doudou	SARR	Psychiatrie
M. Amadou Makhtar	SECK	Psychiatrie
M. Gora	SECK	Physiologie
Mme Hassanatou TOURE	SOW	Biophysique
M. Abdourahmane	TALL	O.R.L.
M. Alé	THIAM	Neurologie

***ASSISTANTS DE FACULTE - ASSISTANTS
DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX***

* * *

Melle Agaïcha Tamdette	ALFIDJA	Physiologie
M. Boubacar Samba	DANKOKO	Médecine Préventive
M. Abdoulaye Séga	DIALLO	Histologie-Embryologie
M Alassane	DIATTA	Biochimie Médicale

• *Associé*

M. Dialo	DIOP	Bactériologie-Virologie
M. Mamadou	DIOP	Anatomie (Cancérologie)
M. Moctar	DIOP	Histologie-Embryologie
M. Saliou	DIOP	Hématologie
Mme Awa Oumar TOURE	FALL	Hématologie
Mme Mame Coumba GAYE	FALL	Médecine Légale
M. Oumar	FAYE	Histologie-Embryologie
M. El Hadj Alioune	LO	Anatomie (Organogénèse)
M. Ismaïla	MBAYE	Médecine Légale
M. Mamadou	MBODJ	Biophysique
M. Oumar	NDOYE	Biophysique
M. Ndéné Gaston	SARR	Biochimie Médicale
M. Kamadore	TOURE	Médecine Préventive
M. Issa	WONE	Médecine Préventive

**CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS
DES SERVICES UNIVERSITAIRES DES HOPITAUX**

* * *

Mme Aïssata LY	BA	Radiologie
Mme Marième GUEYE	BA	Gynécologie-Obstétrique
M. Maguette	BA	Chirurgie Générale
M. Mamadou Diarra	BEYE	Anesthésie-Réanimation
Mme Elisabeth FELLER	DANSOKHO	Maladies Infectieuses
M. Ahmadou	DEM	Cancérologie
Melle Ndèye Méry	DIA	Maladies Infectieuses
M. Saïdou	DIALLO	Médecine Interne I
M. Oumar	DIARRA	Chirurgie Générale
M. Charles Bertin	DIEME	Orthopédie-Traumatologie
M. Rudolph	DIOP	Stomatologie
Mme Fatou SENE	DIOUF	Neurologie
M Papa Ahmed	FALL	Urologie
M. Oumar	KANE	Anesthésie-Réanimation
* M. Abdoul Aziz	KASSE	Cancérologie
Mme Aminata DIACK	MBAYE	Pédiatrie
M Philippe Marc	MOREIRA	Gynécologie obstétrique
M. Amadou Koura	NDAO	Neurologie
M. Moustapha	NDIAYE	Neurologie

• *Associé*

Mme Ndèye Maimouna	NDOUR	Médecine Interne II
*M. Abdou	NIANG	Néphrologie
Mme Suzanne Oumou	NIANG	Dermatologie
M Moussa	SEYDI	Maladies Infectieuses
Mme Aïda	SYLLA	Psychiatrie
M Mamadou Habib	THIAM	Psychiatrie
M. Silly	TOURE	Stomatologie

ATTACHES CHEFS DE CLINIQUE

* * *

M. Oumar	BA	Pneumophtisiologie
M. Mamadou	COUME	Médecine Interne I
M. Mor	NDIAYE	Pneumophtisiologie

ATTACHES - ASSISTANTS

* * *

M ^{me} Nafissatou NDIAYE	BA	Anatomie-Pathologie
M ^{lle} Fatou	DIALLO	Biochimie Médicale
M. Papa	NDIAYE	Médecine Préventive

* *Associé*

II - PHARMACIE

PROFESSEURS TITULAIRES

* * *

M. Doudou	BA	Chimie Analytique et Toxicologie
M. Emmanuel	BASSENE	Pharmacognosie
M. Cheikh Saad Bouh	BOYE	Bactériologie-Virologie
M. Alioune	DIEYE	Immunologie
* M. Babacar	FAYE	Pharmacologie-Pharmacodynamie
M. Issa	LO	Pharmacie Galénique
* M. Souleymane	MBOUP	Bactériologie-Virologie
* M. Oumar	NDIR	Parasitologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

* * *

M. Mamadou	BADIANE	Chimie Thérapeutique
*M Aynina	CISSE	Biochimie Pharmaceutique
M. Mounirou	CISS	Toxicologie
M. Balla Moussa	DAFFE	Pharmacognosie
Mme Aïssatou GAYE	DIALLO	Bactériologie-Virologie
Mme Aminata SALL	DIALLO	Physiologie Pharmaceutique
M. Amadou	DIOUF	Toxicologie
M. Pape Amadou	DIOP	Biochimie Pharmaceutique

MAITRES-ASSISTANTS

* * *

Melle Issa Bella	BA	Parasitologie
*M. Amadou Moctar	DIEYE	Pharmacologie
M. Yérim Mbagnick	DIOP	Chimie analytique
Mme Rita BEREHOUNDOUGOU	NONGONIERMA	Pharmacognosie
M. Matar	SECK	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
M. Oumar	THIOUNE	Pharmacie Galénique

* Associé

ASSISTANTS

* * *

M. Mounibé	DIARRA	Physique Pharmaceutique
M. William	DIATTA	Botanique
M ^{elle} Thérèse	DIENG	Parasitologie
M. Macoura	GADJI	Hématologie
M ^{elle} Edwige	GOMIS	Pharmacognosie
M. Ahmédou Bamba K. & M. Djibril	FALL FALL	Pharmacie Galénique Pharmacie Chimique et Chimie Organique
M. Mamadou	FALL	Toxicologie
M. Modou	LO	Botanique
*M. Augustin	NDIAYE	Physique Pharmaceutique
M. Bara	NDIAYE	Chimie Analytique
*M. Mamadou	NDIAYE	Pharmacologie
Mme Maguette Dème SYLLA	NIANG	Immunologie-Biochimie
Mme Philomène LOPEZ	SALL	Biochimie Pharmaceutique
M. Mamadou	SARR	Physiologie Pharmaceutique
*M. Elimane Amadou & M. Alassane	SY WELE	Chimie Générale et Minérale Chimie Physique

ATTACHES

* * *

Mme Amy THIAM	FALL	Chimie Analytique
M Mor	GUEYE	Physiologie Pharmaceutique
M. Pape Madièye	GUEYE	Biochimie Pharmaceutique
M. Modou Oumou	KANE	Physiologie Pharmaceutique
M. Sarra	NGOM	Pharmacie Galénique

* *Assistant Associé*
& *En Stage*

III - CHIRURGIE DENTAIRE

PROFESSEURS TITULAIRES

* * *

M. Ibrahima	BA	Pédodontie-Prévention
M ^{me} Ndioro	NDIAYE	Odontologie Préventive et Sociale

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

* * *

* M. Boubacar	DIALLO	Chirurgie Buccale
M. Papa Demba	DIALLO	Parodontologie
M ^{me} Charlotte FATY	NDIAYE	Chirurgie Buccale
M. Malick	SEMBENE	Parodontologie

MAITRES-ASSISTANTS

* * *

M. Daouda	CISSE	Odontologie Préventive et Sociale
*M. Falou	DIAGNE	Orthopédie Dento-Faciale
M ^{me} Fatou	DIOP	Pédodontie-Prévention
M ^{elle} Fatou	GAYE	Odontologie Conservatrice Endodontie
M. Abdou Wahab	KANE	Odontologie Conservatrice Endodontie
*M. Mohamed Talla	SECK	Prothèse Dentaire
M ^{elle} Soukèye DIA	TINE	Chirurgie Buccale
M. Abdoul Aziz	YAM	Pédodontie

ASSISTANTS DE FACULTE

* * *

M. Abdou	BA	Chirurgie Buccale
M ^{me} Aïssatou TAMBA	BA	Pédodontie-Prévention
M ^{me} Khady DIOP	BA	Orthopédie Dento-Faciale
M. Henri Michel	BENOIST	Parodontologie
M ^{me} Adam Marie A. SECK	DIALLO	Parodontologie
*M. Khalifa	DIENG	Odontologie Légale
*M. Lambane	DIENG	Prothèse Dentaire

* *Maître Assistant - Associé*

I. Malick	MBAYE	Odontologie Conservatrice Endodontie
A. Edmond	NABHANE	Prothèse Dentaire
M. Cheikh	NDIAYE	Prothèse Dentaire
M. Paul Dédé Amadou	NIANG	Chirurgie Buccale
M. Farimata Youga	SARR	Matières Fondamentales
M. Babacar	TOURE	Odontologie Conservatrice Endodontie
M. Saïd Nour	TOURE	Prothèse Dentaire

ATTACHES

* * *

M. Babacar	FAYE	Odontologie Conservatrice Endodontie
M. Daouda	FAYE	Odontologie Préventive et Sociale
M. Malick	FAYE	Pédodontie-Orthodontie
M. Mohamed	SARR	Odontologie Conservatrice Endodontie
M ^{me} Fatoumata DIOP	THIAW	Odontologie Conservatrice Endodontie

** Assistant Associé*

DEDICACES

Au nom d'ALLAH
Le Tout-Puissant
Je dédie ce
Modeste travail
Au Prophète

Au nom d'ALLAH
Le Tout-Puissant
Je dédie ce
Modeste travail
Au Prophète

**MOUHAMADOU
RASSOULILAH
(P.S.L.)**

DEDICACES

A mes parents :

Je ne saurais jamais trouver les mots adéquats pour vous rendre grâce pour tout ce que vous avez fait pour nous dans le but de nous rendre utiles dans la vie et heureux au plus haut degré.

Ce que je ressens et que je souhaite pour vous va même au delà de ces mots que j'exprime à travers ce travail qui ne serait jamais arrivé à terme sans votre soutien de tous les jours.

Merci de nous avoir beaucoup aidés à esquiver les pièges de la vie.

Que le Bon Dieu, témoin de toute l'affection que je porte pour vous, vous garde encore très longtemps parmi nous et en très bonne santé, et qu'il ait vraiment pitié de vous comme vous aviez eu pitié de nous lorsque nous étions très petits.

A mes frères et sœurs :

Vous m'avez tous soutenu depuis le début, et voilà maintenant que je suis arrivé à la fin de mes études, en compagnie de vos soutiens sans faille et sous toutes les formes, sans quoi l'aboutissement de ce travail serait encore plus délicat.

Veillez ainsi trouver à travers cette réalisation, l'expression de ma profonde gratitude.

Que le Bon Dieu consolide davantage notre solidarité familiale et qu'il exauce pour chacun d'entre nous, les prières les plus chères.

A mes beaux-frères :

Aly Daff, Fallou Wade, Alioune Sarr, veuillez trouver dans ce travail mes remerciements les plus chers pour avoir bien entretenu nos sœurs.

Grand Daff : mention spéciale pour toi, tu es comme un frère. Alors merci pour tout ce que tu fais pour nous, sans trop rentrer dans les détails.

A mes neveux et nièces :

Votre oncle vous souhaite tout le bonheur du monde que vous méritez. Grandissez vite et bien, et que le Tout Puissant vous protège en tout.

A mes oncles et tantes :

Merci de vous être intéressés depuis le début à mes études, je vous en suis très reconnaissant et vous associe au succès de cette réalisation.

A mes cousins et cousines :

Je vous remercie infiniment pour l'affection que vous avez tous en moi. Ce travail est le vôtre.

A tous mes amis :

Je ne peux citer de noms de peur d'en oublier certains. Mais je suis sûr que vous saurez tous vous reconnaître à travers cette dédicace. On a passé ensemble de bons moments inoubliables durant tout notre cursus ; puisse le Tout Puissant entretenir à jamais notre amitié.

A mes co-thésards (groupe Bordetella) :

Seydou Niang, Birame Dramé, Ousmane Diop, Mama Thiam, Boubacar Konaté, Ramatoulaye Diop, Amy Seck et Dieynaba Konaté, notre collaboration a été très franche ; je ne suis pas prêt d'oublier cette année où l'on a formé un bloc si solidaire qu'il devra impérativement perdurer.

A Mme Thiam née Guète Diallo et à Amy Guèye :

Vous avez intégré le groupe en y apportant fraîcheur et douceur.

Merci pour votre sincère collaboration et votre disponibilité sans faille.

A notre association « Anciens du Lycée Lamine Guèye » :

Ce travail est le vôtre, je vous le dédie du fond du cœur. Bien des succès à chacun d'entre nous.

IN MEMORIAM

A VIEUX BOCOUM arraché très tôt à notre affection :

Que le bonheur que tu n'as jamais connu dans ce monde ci bas te trouve enfin dans l'au-delà.

A ma tante paternelle SIDI MOUSSA BOCOUM qui vient récemment de nous quitter.

A ma grand-mère SEYNABOU DIOP MAME JACQUES

Que la terre vous soit tous légère et que le Bon Dieu Tout-Clément vous accueille dans son Paradis, à vous précisément et à tous ceux qui nous ont quittés.

REMERCIEMENTS

Au Docteur Samba Sow et à tout le personnel de la pharmacie Blaise Diagne :

Merci infiniment d'avoir contribué à ma formation, je vous en serai éternellement reconnaissant.

A Tonton Ameth Mbaye et au personnel de « Sunu Imprimerie » :

Vous n'avez jamais cessé de m'apporter votre aide durant toute ma formation surtout dans le domaine de la papeterie.

Que le Bon Dieu vous paye en bien

PS : mention spéciale à PAA LAA.

A Seydou Dièye et famille :

Merci de votre participation pour la réalisation de cette œuvre.

A tout le personnel de la pharmacie de l'hôpital Principal de Dakar :

Je vous serai très reconnaissant pour toute la compréhension dont vous avez fait preuve à mon égard.

Merci de m'avoir aimablement intégré en votre sein sans aucune forme de complexe.

Que Le Bon Dieu vous accorde sa miséricorde.

A tout le personnel du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Aristide Le Dantec.

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué d'une façon ou d'une autre à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail.

A notre maître et président du jury :

M. Le Professeur José Marie AFOUTOU

C'est un sentiment de joie qui nous anime depuis le jour où vous avez accepté de présider ce jury. Nous avons toujours été séduit par votre disponibilité vis à vis de vos étudiants, votre sens de la responsabilité, votre plénitude de qualités riches, diverses et

variées et de surcroît par votre sens de l'humour qui ne peut laisser personne indifférent.

Nous voici aujourd'hui très fiers et très sûrs de nous ; Ah oui et ceci nous le devons également en grande partie à vous qui êtes nos professeurs et qui avez largement contribué à notre formation.

Ainsi nous ne pouvons nous empêcher de reprendre une de vos expressions habituelles pour illustrer votre mérite : « Très Grands seront les Grands lorsque les petits deviendront Grands ».

Toute notre reconnaissance cher maître.

A notre maître et juge :

M. Amadou DIOUF , maître de conférences agrégé

Nous sommes très ému aujourd'hui de vous compter parmi les membres de ce jury. Vous nous avez inspiré confiance au sein de cette faculté de par votre abnégation, votre dynamisme, votre courage et votre capacité de persévérer davantage.

Vous nous avez également procuré un réel plaisir en acceptant de sacrifier un peu de votre temps pour venir juger notre travail, surtout en cette période très chargée de cette année agonisante.

Ainsi soyez en vivement remercié cher maître.

A notre maître et directeur de thèse :

M. Le Professeur Cheikh Saad-bou BOYE

Travailler avec vous a été un très grand plaisir pour nous, permettez-moi ainsi cher maître de vous témoigner toute notre considération. Vous nous avez mis, tout le parcours durant, sur une ligne de conduite exemplaire qui nous a permis de mener à bien cette présente réalisation. Mais cela ne nous surprend guère de vous, connaissant votre amour du métier et votre capacité de travail extraordinaire qui ne cessent d'accroître la réputation de cette auguste faculté, et qui font de votre modeste personne la fierté de la profession.

Tout en espérant avoir été à la hauteur de la tâche que vous nous aviez confiée, veuillez agréer très cher Professeur nos sentiments les plus respectueux ; et merci encore une fois de nous avoir fait confiance.

A notre maître et juge :

M. Mamadou BADIANE, maître de conférences agrégé

Nous ne serions jamais tranquille dans notre conscience si une telle occasion ne nous eût été offerte pour vous témoigner très sincèrement toute notre gratitude. Pendant tout notre cursus universitaire, nous n'avons jamais cessé d'apprécier vos excellentes qualités qui sont entre autres : disponibilité, générosité, bonté...et j'en passe car la liste est loin d'être exhaustive. Vous ne vous êtes pas seulement limité au statut de Professeur de par votre enseignement riche en qualité, mais vous avez été également comme un père pour nous surtout de par vos conseils pertinents et permanents et vos encouragements qui nous exhortent à aller de l'avant.

Permettez-moi encore une fois cher Professeur, de vous renouveler toute notre reconnaissance. Merci infiniment.

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

Vu

Le Président de Jury

Vu

Le Doyen

INTRODUCTION

Les programmes d'assurance de la qualité constituent un moyen efficace pour maintenir la qualité des résultats des laboratoires de diagnostic dans le monde entier et la relever le cas échéant.

On estime généralement que la qualité d'une épreuve de laboratoire est synonyme de sa fiabilité (exactitude) et de sa reproductibilité (précision). Cependant, en microbiologie la qualité se situe au-delà de la simple perfection technique et prend en compte la rapidité, le coût et l'utilité ou l'intérêt clinique de l'épreuve.

Les tests de laboratoire sont en général onéreux, et avec les progrès de la médecine, tendent à absorber une part toujours plus grande du budget de la santé.

A- Première partie: Généralités sur l'assurance qualité

A-I GENERALITES

A-I-1 Définitions

Le domaine de la qualité utilise un vocabulaire spécifique qu'il est important de maîtriser pour tout biologiste qui souhaite monter un système d'assurance qualité dans son laboratoire.

Pour cela il convient de se reporter aux définitions de la norme ISO 8402 version 1994 pour les termes suivants: (11)

Qualité : ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confère l'aptitude à satisfaire les besoins exprimés et implicites.

Assurance qualité : ensemble des 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 de la qualité.

Pour simplifier ce langage très technique, il est important de retenir que la qualité vise à la satisfaction des besoins du client ou de l'utilisateur, tandis que l'assurance qualité donne confiance au producteur de service.

L'assurance de la qualité et la confiance qu'elle confère dans les processus ne peut être obtenue qu'au prix d'un travail préparatoire où il est essentiel d'écrire les procédures et instructions et de documenter les preuves et les traces consécutives à ces processus.

Pour être de bonne qualité, un test diagnostique doit être cliniquement utile, c'est-à-dire qu'il doit aider à prévenir ou à traiter une maladie. Les autres critères de qualité d'un test diagnostique sont les suivants :

- La fiabilité : le résultat est-il correct ?
- La reproductibilité : obtient-on le même résultat lorsqu'on répète le test ?
- La rapidité : le test est-il suffisamment rapide pour être utile au médecin dans la prescription du traitement ?
- Le rapport coût-avantage : le coût du test est-il raisonnable au regard des avantages qu'il présente pour le malade et la communauté ?

A-I-2 Facteurs influant sur la fiabilité et la reproductibilité des résultats des analyses de laboratoire

Les diverses sources d'erreurs peuvent venir :

- *Du personnel* : les résultats de l'auxiliaire ou du technicien

de laboratoire sont directement liés à la qualité de l'instruction et de la formation qu'il a reçues, à son expérience et à ses conditions d'emploi.

- *De facteurs environnementaux* : le manque de place pour travailler, un éclairage et/ou une ventilation insuffisants, des températures extrêmes, un bruit excessif ou des conditions de travail non conformes à la sécurité peuvent modifier les résultats.

- *Des prélèvements* : la méthode de prélèvement et le moment auquel il est effectué, ainsi que son origine, sont souvent hors du contrôle direct du laboratoire, mais ont des conséquences directes sur l'aptitude de celui-ci à obtenir des résultats fiables.

Les autres facteurs que le laboratoire peut contrôler et qui ont une influence sur la qualité sont le transport, l'identification, la conservation et la préparation (traitement) des prélèvements.

Le laboratoire a donc un rôle à jouer dans la formation des personnels qui recueillent et transportent les prélèvements. Il doit mettre à leur disposition des instructions écrites et les revoir régulièrement avec eux (personnels clinique et infirmier).

- *Du matériel de laboratoire* : la qualité des réactifs, des produits cliniques, de la verrerie, des colorants, des milieux de culture et des animaux de laboratoire, a une influence sur la fiabilité des résultats.

- *Des méthodes* : certaines méthodes sont plus fiables que d'autres .

- *Des appareils* : le manque d'appareils ou l'utilisation d'appareils ne répondant pas aux normes ou mal entretenus entraînera des résultats peu fiables.

- *Des examens et lectures* : une lecture trop rapide des résultats ou le fait de ne pas examiner un nombre suffisant de champs microscopiques, peut entraîner des erreurs.

- *Des rapports* : la transcription d'erreurs ou la remise de rapports incomplets pose des problèmes.

A-I-3 Qualité de l'interprétation des résultats

L'interprétation est particulièrement importante en microbiologie. A chaque étape de l'examen d'un prélèvement, il faut interpréter les résultats de façon à choisir le test optimal (rapidité, fiabilité) pour l'étape suivante.

A-I-4 Assurance de la qualité au laboratoire de microbiologie

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. Elle doit être :

- *exhaustive*, afin de couvrir chaque étape du cycle, depuis le prélèvement des échantillons jusqu'à l'envoi du rapport au médecin (voir figure1) ;
- *rationnelle*, pour se contenter des étapes les plus importantes de l'analyse ;
- *régulière*, afin d'assurer une vérification continue de méthodes utilisées ;
- *fréquente*, pour déceler et corriger les erreurs au fur et à mesure.

En outre l'assurance qualité au laboratoire revêt plusieurs aspects :

➤ Il s'agit d'abord d'une nécessité économique : la tendance actuelle pour une meilleure efficacité économique est au regroupement des laboratoires au sein duquel il y aura partage des moyens et des bénéfices. Comment avoir confiance en ses partenaires si ce n'est en respectant chacun les règles de l'assurance qualité ?

Plus la taille d'un laboratoire est grande, plus le personnel est nombreux, plus la direction s'éloigne de la paillasse. La mise en place d'un système qualité permet de définir les responsabilités de chacun et de déléguer efficacement son autorité. Enfin il est important de satisfaire ses clients directs ou indirects pour les fidéliser, voire développer les activités du laboratoire.

➤ Il s'agit ensuite d'une nécessité technique, des règles claires de fonctionnement permettant une organisation et une communication efficaces en particulier dans le cas d'un plateau technique.

Un système de qualité devra définir avec clarté comme nous le verrons plus loin, les responsabilités et autorité de chacun.

➤ La pression des autorités de tutelle se fait plus forte. L'agence du médicament a remplacé le laboratoire national de la santé et reprend l'organisation du contrôle national de qualité.

Le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA) prévu en application de l'article 9-1 du décret n° 76-1004 du 04 Novembre 1976, modifié par le décret n°93-354 du 15 Mars, doit paraître au Journal officiel et devrait servir de référentiel pour les inspecteurs des laboratoires.

Un laboratoire qui fonctionne en respectant les règles de l'assurance qualité n'a rien à redouter d'une telle inspection. (8)

➤ Développement des relations clients / fournisseurs : lorsque le laboratoire a mis en place un système d'assurance qualité, il peut valoriser la qualité des services fournis et participer à des études pour les laboratoires pharmaceutiques qui veulent disposer de données fiables pour les autorisations de mise sur le marché.

Il peut proposer à ses cliniciens des services spéciaux comme une aide à la décision clinique ou à l'interprétation des résultats.

Enfin le laboratoire est lui même client. En sélectionnant des fournisseurs industriels dont le système qualité est certifié, en particulier en s'orientant vers le choix de systèmes analytiques fermés, il s'établit une chaîne de la qualité basée sur la confiance qui facilite grandement les tâches quotidiennes du biologiste.

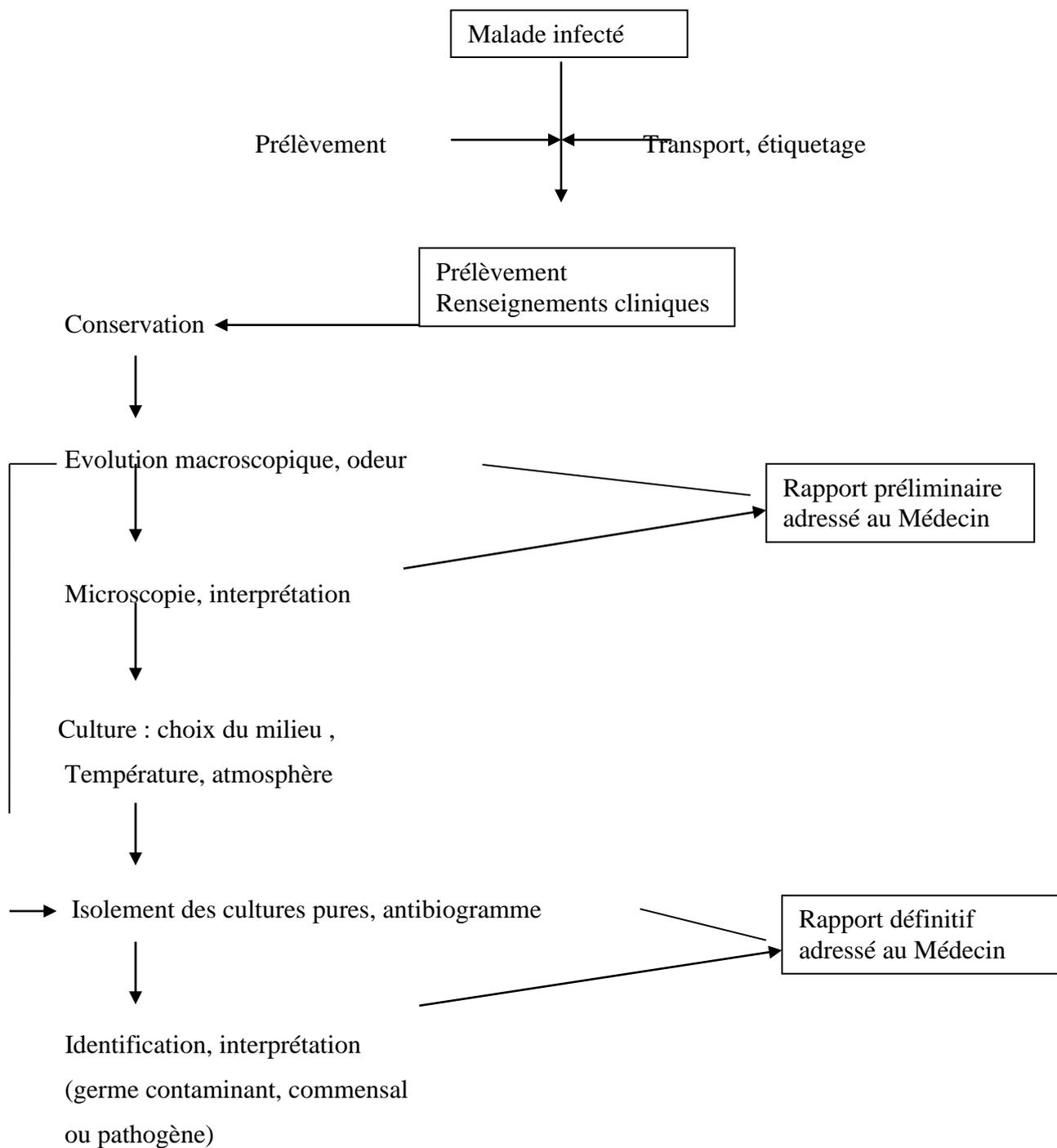


Figure 1 : Etape des investigations de laboratoire sur 1 sujet infecté

A-I-5 Types d'assurance de la qualité

L'assurance de la qualité permet de faire en sorte que les tests onéreux soient utilisés de façon aussi économique que possible.

Elle détermine également si les nouveaux tests sont intéressants ou non, permet d'améliorer les résultats des laboratoires cliniques et de santé publique et autorise la comparaison des résultats obtenus dans différents laboratoires.

En effet , il existe deux types d'assurance de la qualité :

- **L'assurance interne de la qualité** : elle est appelée **CONTROLE DE LA QUALITE**.

Cela signifie que chaque laboratoire a un programme de vérification de la qualité de ses propres tests.

Le contrôle interne de la qualité comprend théoriquement :

- Une surveillance continue de la qualité des tests.
- Une vérification complète à chaque étape, depuis le prélèvement de l'échantillon (dans la mesure du possible) jusqu'à la remise du rapport.

Les laboratoires ont une responsabilité éthique vis à vis du malade et doivent fournir des résultats exacts et informatifs.

- **L'assurance externe de la qualité** : elle est appelée **EVALUATION DE LA QUALITE**.

Cela signifie que les résultats du laboratoire sont contrôlés par un organisme extérieur. Dans certains pays, cette participation est obligatoire (réglementée par le gouvernement) et indispensable pour obtenir la licence d'exercice.

L'évaluation externe de la qualité comprend :

- La surveillance périodique de la qualité des tests.
- La vérification ponctuelle des tests d'identification, et parfois des techniques d'isolement.

A-II LES CRITERES DE QUALITE EN MICROBIOLOGIE

A-II-1 Intérêt clinique

Pour un test microbiologique, un critère important de qualité est la mesure dans laquelle il contribue à la prévention ou à la guérison des maladies infectieuses : c'est ce qu'on appelle son

intérêt clinique. L'intérêt clinique ne peut être attesté que lorsque la communication entre le clinicien et le laboratoire est bonne.

Pour illustrer cet intérêt clinique, voici quelques exemples :

1. Si quelques colonies de bacilles à Gram négatifs sont isolées dans les expectorations ou le prélèvement de gorge d'un malade hospitalisé, une identification plus poussée et un antibiogramme ne présentent aucun intérêt clinique, puisque ni l'un ni l'autre n'auront un effet sur le traitement du malade.

2. Si l'on isole *Streptococcus pyogenes*, un antibiogramme complet ne présente aucun intérêt clinique, puisque la benzylpénicilline est le médicament de choix et qu'elle est toujours active in vitro.

3. Si l'on isole *Escherichia coli* chez un cas sporadique de diarrhée, l'identification de sérotype ne présente aucun intérêt clinique, puisqu'il n'y a pas de corrélation clairement établie entre le sérotype et le pouvoir pathogène.

4. Si un frottis coloré par la technique de Gram montre une flore mixte anaérobie, l'identification en routine de cette dernière ne présente aucun intérêt clinique. Elle serait coûteuse en temps et en matériel et n'aurait aucun effet sur le traitement du malade.

5. Si l'on isole une levure dans un prélèvement des voies respiratoires, un test d'identification de *Cryptococcus* doit être effectué. Des tests d'identification plus poussés ne présentent aucun intérêt clinique, puisqu'ils n'auraient aucun effet sur la prise en charge du malade. En résumé, un test de bonne qualité est un test exact et qui donne des résultats utiles pour la prévention ou le traitement de l'infection. Il n'est pas nécessaire d'isoler ni d'identifier tous les types de micro-organismes présents dans le prélèvement.

A-II-2 Fiabilité

On mesure la fiabilité des tests donnant des résultats quantitatifs, d'après l'écart que ces derniers présentent par rapport à la valeur réelle.

Voici quelques exemples de tels tests :

- Dosage sérique des antibiotiques ;
- Mesure des valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques in vitro;
- Dosage sérique des antibiotiques.

On mesure la fiabilité des tests donnant des résultats qualitatifs en voyant si le résultat est correct. Voici des exemples de tels tests :

- Identification des germes pathogènes ;
- Test de sensibilité aux antibiotiques d'un isolement par la méthode des disques.

Il est indispensable d'utiliser une terminologie normalisée pour les micro-organismes afin de garantir la fiabilité des résultats. On emploiera toujours la nomenclature internationale reconnue.

Par exemple :

Staphylococcus aureus et non " streptocoque pathogène"

Streptococcus pyogenes et non "streptocoque hémolytique".

Il est indispensable d'employer des méthodes uniformisées et approuvées.

Par exemple : les tests de sensibilité à l'aide de disques imprégnés doivent être effectués selon une technique reconnue au plan international, comme la méthode de Kirby Bauer modifiée.

A-II-3 Reproductibilité

Deux facteurs peuvent diminuer la reproductibilité ou la précision d'un test microbiologique.

1- *le manque d'homogénéité* : un prélèvement unique provenant d'un malade peut contenir plus d'un germe. Des mises en culture répétées peuvent par conséquent entraîner l'isolement de différents micro-organismes.

2- *le manque de stabilité* : avec le temps, les germes présents dans un prélèvement se multiplient ou meurent à des vitesses différentes. Les cultures répétées peuvent par conséquent entraîner l'isolement de différents micro-organismes.

Pour améliorer la précision, il faut donc tester les prélèvements le plus tôt possible.

A-II-4 Efficacité

L'efficacité d'un test microbiologique est sa capacité à permettre de diagnostiquer correctement un germe pathogène ou une affection pathologique.

Deux critères permettent de la mesurer :

1- *Sensibilité*

$$\text{Sensibilité} = \frac{\text{Nombre total de résultats positifs}}{\text{Nombre total de sujets non infectés}}$$

Plus un test est sensible, moins on obtient de faux-négatifs.

Par exemple, la sensibilité du milieu de Mac Conkey est faible pour l'isolement de *Salmonella typhi* dans les selles. Cet important germe entéropathogène est souvent masqué par la prolifération de bactéries intestinales non pathogènes.

2- *Spécificité*

$$\text{Spécificité} = \frac{\text{Nombre total de résultats négatifs}}{\text{Nombre total de sujets non infectés}}$$

Plus un test est spécifique, moins on obtient de faux-positifs.

Par exemple :

- La coloration des crachats par la méthode de Ziehl Neelsen est très spécifique pour le diagnostic de la tuberculose car elle ne donne que peu de faux-positifs.
- La coloration des urines par la même méthode de Ziehl Neelsen est beaucoup moins spécifique car elle donne beaucoup de faux-positifs (du fait des mycobactéries atypiques).
- Le test de WIDAL a une faible spécificité pour le diagnostic de la fièvre typhoïde car les réactions d'agglutination croisée avec les anticorps résultant d'infections antérieures par des sérotypes de Salmonelles apparentés donnent des résultats faussement positifs.

La sensibilité et la spécificité d'un test sont intimement liées. En changeant ses critères de limitation, on peut augmenter la sensibilité d'un test aux dépens de sa spécificité, et vice versa.

A-III Contrôle interne de la qualité

A-III-1 Les exigences

Un programme de contrôle interne de la qualité doit être :

- pratique
- réaliste
- économique

Un programme de contrôle interne de la qualité ne doit pas chercher à évaluer chaque méthode, réactif et milieu de culture chaque journée de travail. Il doit permettre d'évaluer chaque méthode, réactif et milieu de culture en fonction d'un calendrier pratique basé sur l'importance de chacun de ces éléments pour la qualité du test dans son ensemble.

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.

➤ Responsabilité de la direction

La direction doit énoncer clairement et par écrit sa politique qualité et exprimer les services particuliers qui correspondent aux besoins de ses clients / utilisateurs : par exemple dosages spéciaux, participation à des protocoles, aide à l'interprétation, maîtrise du temps, maîtrise des coûts etc...

L'amélioration continue des processus doit faire partie de la politique qualité.

Les responsabilités et autorités de chacun doivent être définies par écrit.

Un organigramme du laboratoire (demandé par le GBEA) peut servir de support. Deux remarques doivent être faites à ce sujet :

- Il ne peut pas y avoir de responsabilité sans autorité (c'est à dire pouvoir ou liberté d'action).
- Une responsabilité ne se délègue pas au contraire d'une autorité.

La direction a une obligation de moyens, c'est à dire qu'elle doit fournir les locaux, matériels, réactifs, personnels, formation ... et tout autre moyen jugé nécessaire pour atteindre les objectifs de la politique qualité.

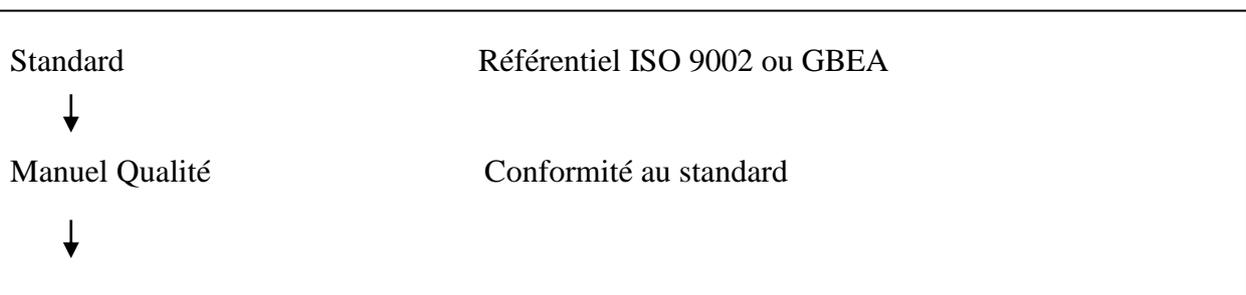
Lorsque la taille du laboratoire le justifie, un représentant de la direction doit être nommé. Ce dernier aura toute autorité pour faire fonctionner le système qualité et rendre compte à la direction. Ce représentant, qui doit être bien perçu par le personnel, aura un rôle de dynamisation.

➤ **Systeme qualité**

Le système qualité est l'ensemble de l'organisation, des procédures, des processus et des moyens nécessaires pour mettre en œuvre le management de la qualité (norme ISO 8402 : 1994).

Il est préférable d'établir un système qualité à plusieurs niveaux (voir figure) : le référentiel choisi, deux ou trois niveaux organisationnels ou opératoires et la documentation produite. (12)

Les fiches de travail seront modifiées très souvent, les procédures plus rarement et le manuel qualité exceptionnellement. Ce type d'organisation assure une grande souplesse au système.



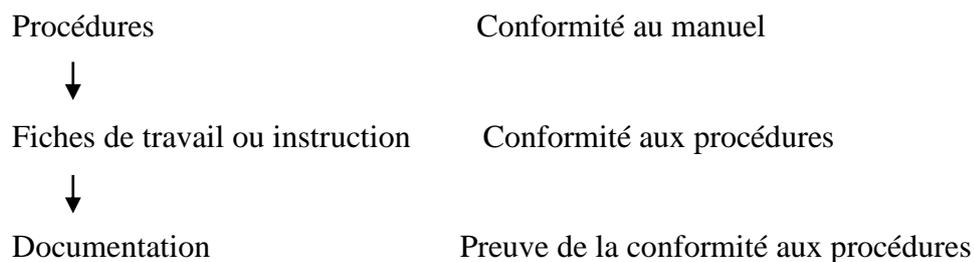


Figure Système qualité (14)

➤ **Maîtrise des documents**

Les responsabilités doivent être définies en matière de rédaction, approbation et diffusion des documents qualité (manuel, procédures, fiches).

Pour s'assurer de la maîtrise de l'information, la mise à jour des documents doit se faire de manière efficace.

Chaque procédure ou fiche d'instruction modifiée doit être vérifiée et approuvée, avoir un indice de révision et une date d'application.

Une liste de distribution tenue à jour doit permettre la distribution effective des nouveaux documents qualité et le retrait des documents obsolètes.

Ceux-ci doivent être archivés pendant un temps suffisant décrit dans le manuel qualité.

➤ **Maîtrise des processus**

C'est la base du métier de biologiste. Généralement, les laboratoires sont convaincus qu'ils ont la maîtrise de leur processus mais sont incapables de le prouver.

Des procédures opératoires doivent être écrites. Elles décrivent les responsabilités pour les différentes actions et décisions et les preuves ou traces de celles-ci chaque fois que cela est nécessaire. Quand c'est possible une représentation graphique sous forme de logigramme est souhaitable, car elle concourt à rendre simple la procédure. Le GBEA donne une liste des procédures opératoires obligatoires.

L'environnement approprié et les équipements adéquats pour la mise en place effective et efficace de ces processus doivent être décrits.

Bien évidemment, ces processus seront conformes aux normes, à l'état de l'art, aux objectifs qualité et les procédures écrites seront strictement appliquées. Les équipements doivent faire l'objet d'une maintenance appropriée recommandée par le fabricant, les preuves doivent en être conservées.

Enfin, la preuve de la qualification des opérateurs qui appliquent les processus doit être apportée.

➤ **Actions correctives et préventives**

Toutes les réclamations émises par le client / utilisateur et 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.

➤ **Audit de qualité interne**

Définition (norme ISO 8402 : 1994)

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.

L'auditeur doit être formé à l'audit qualité, il doit être indépendant et impartial et agir avec intégrité.

Le rapport d'audit fera état du référentiel sur lequel était basé l'audit, des objectifs de celui-ci, des différents participants [auditeur (s) et audités], et il rapportera un certain nombre de non-conformités.

L'auditeur peut faire par écrit des recommandations en rapport ou non avec les non-conformités.

Il ne faut pas confondre un audit de qualité interne sollicité par le laboratoire d'analyses médicales pour son usage propre, et dont les recommandations finales n'ont aucun caractère obligatoire, avec une inspection du laboratoire par un pharmacien ou un médecin inspecteur ou un inspecteur de santé.

➤ **Formation du personnel**

Chaque fonction ou poste doit être décrit en terme de compétences.

Les qualifications et formations de chaque employé (biologiste ou technicien) doivent être documentées. Pour tout nouvel employé, un plan de formation doit être établi.

La documentation doit permettre de déterminer la fonction ou le poste que peut remplir l'employé et la formation qu'il lui reste à acquérir pour occuper un poste différent ou plus complexe.

Enfin, il faut former le personnel à la qualité. En donnant une formation et une qualification appropriées, on peut attendre du personnel initiative et responsabilité.

A-III-2 Elaboration de procédures (ou méthodes)

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

A-III-2-1 Manuel pratique du laboratoire

Chaque laboratoire doit disposer d'un manuel pratique couvrant les rubriques suivantes :

- Nettoyage du plan de travail
- Hygiène personnelle
- Séparation entre zones de travail et secteurs où l'on mange et où l'on fume.
- Mesures de sécurité
- Manipulation et élimination du matériel infecté
- Vaccinations appropriées
- Entretien du matériel
- Prélèvements
- Enregistrement des prélèvements
- Elimination des prélèvements défectueux
- Traitement des prélèvements
- Enregistrement des résultats
- Transmission des résultats

Ce manuel pratique doit être scrupuleusement suivi et régulièrement révisé et mis à jour.

A-III-2-2 Entretien du matériel

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. (3)

Le tableau 1 montre le calendrier d'entretien courant des principaux appareils. Leurs températures de fonctionnement peuvent être enregistrées sur une fiche comme celle de la figure 2.

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		Remplacer les balais une fois par an

	fois que des tubes de verre sont cassés ou renversés		
Etuve	Nettoyer les parois intérieures et les rayonnages une fois par mois	Noter la température au début de chaque journée de travail (valeurs admises : $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$)	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 (valeurs admises : $2-8^{\circ}\text{C}$)	Tous les 6 mois

Appareil _____ Température _____
Salle _____

Procéder à une lecture quotidienne. Vérifier si l'indication de température est acceptable. Si elle est aberrante, noter la température dans l'espace prévu à cet effet.

Date	Jan	Fév	Mars	Avr	Mai	Juin	Juil	Août	Sept	Oct	Nov	Déc	Date
1													1
2													2
3													3
4													4
5													5
6													6
7													7
8													8
9													9
10													10
11													11
12													12
13													13
14													14
15													15
16													16
17													17
18													18
19													19
20													20
21													21
22													22
23													23
24													24
25													25
26													26
27													27
28													28

29													29
30													30
31													31

Figure 2. Enregistrement de la température de fonctionnement des appareils

A-III-3 : Contrôle de la qualité des réactifs biologiques et chimiques

A-III-3-1 Milieux de culture

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.

Pour obtenir les meilleurs résultats, il convient de porter une attention particulière aux différents points qui suivent.

A-III-3-1-1 Choix des milieux

Un laboratoire efficace stocke le plus petit nombre possible de milieux différents correspondant aux types de tests effectués. Par exemple, une bonne base de gélose peut servir à toutes sortes de préparations, par exemple la gélose au sang, la gélose chocolat et plusieurs milieux sélectifs.

Un milieu très sélectif (gélose *Salmonella* / *Shigella* ou gélose désoxycholate- citrate) et un milieu moins sélectif (milieu de Mac Conkey) sont en général tout ce dont on a besoin pour l'isolement des Enterobacteriaceae pathogènes présentes dans les selles.

Un milieu de culture spécial doit être ajouté pour la recherche de *Campylobacter jejuni*

.

A-III-3-1-2 Commande et Conservation des milieux déshydratés

1. Commander des quantités qui seront utilisées dans les 6 mois, ou au plus tard dans l'année qui suit.
2. Toute la commande devra être répartie dans des récipients qui seront utilisés en 1 à 2 mois.
3. Dès réception, fermer soigneusement tous les couvercles des récipients. Les milieux déshydratés absorbent l'humidité atmosphérique. En climat humide, sceller les couvercles à la paraffine (remplir l'espace situé entre le couvercle et le récipient avec de la paraffine fondue, puis la laisser durcir).
4. Inscrire la date de réception sur chacun des récipients.
5. Les conserver dans un endroit sombre, frais et bien aéré.
6. Effectuer des rotations du stock de façon que les produits les plus anciens soient utilisés les premiers.
7. Lorsqu'un récipient est ouvert, inscrire dessus la date d'ouverture.
8. Jeter tous les milieux déshydratés durcis ou dont la couleur a foncé.
9. Conserver une liste écrite des milieux en stock.

A-III-3-1-3 Préparation des milieux

- a) Suivre scrupuleusement les instructions du fabricant pour la préparation.
- b) Préparer une quantité de milieu qui sera utilisée avant la date limite de conservation.

A-III-3-1-4 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
- Récipients à bouchons vissés : trois mois
- Boîtes de pétri, si elles sont dans des sacs en plastique scellés : quatre semaines

A-III-3-1-5 Contrôle de la qualité

des milieux préparés (5)

a- **Vérification 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 s'écarte de plus de 0,2 unités de la norme, l'ajuster avec un acide ou une base, ou préparer un nouveau lot.

b- **Epreuve de stérilité** : 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 deux jours. Réfrigérer le reste.

Si l'on observe plus de deux colonies par boîte, jeter l'ensemble du lot.

c- **Epreuve d'efficacité** : le laboratoire doit conserver une série de souches de référence pour surveiller l'efficacité du milieu. Une liste de ces souches est proposée dans le tableau 2. Elles peuvent être obtenues dans le cadre du travail ordinaire, achetées dans le commerce ou être fournies par des laboratoires officiels. Une liste des épreuves d'efficacité à appliquer aux milieux de culture couramment employés figure dans le tableau 3.

La marche à suivre lorsqu'on effectue des épreuves d'efficacité sur de nouveaux lots est la suivante :

- Préparer une suspension de la souche de référence avec un trouble à peine visible, équivalent à celui de l'étalon de sulfate de baryum utilisé dans la méthode de Kirby Bauer modifiée (Mac Farland 0,5) et utiliser le contenu d'une anse comme inoculum.
- Laisser incuber pendant la durée habituelle. Lire le résultat comme d'habitude.
- Noter soigneusement le résultat.

Tableau II : Souches de référence proposées pour le contrôle de la qualité

Cocci à Gram positif	Enterobacteriaceae
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212 ou 33186) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>
Germes exigeants à Gram négatif	Autres bacilles à Gram négatif
<i>Branhamella catarrhalis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> type b Béta-lactamase négatif Béta-lactamase positif <i>Haemophilus parainfluenzae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> biovar <i>Iwoffii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) <i>Vibrio cholerae</i> (non 01)
Germes anaérobies	Champignons
<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Candida albicans</i>

Tableau III - Epreuves d'efficacité des milieux couramment employés

Milieu	Durée d'incubation	Micro-organisme de contrôle	Résultat attendu
Milieu bile-esculine	24 h	<i>E. faecalis</i>	Croissance bactérienne et noircissement
Gélose au sang	24 h, CO ₂ (cloche à bougie)	<i>S. pyogenes</i>	Pas de croissance bactérienne
Gélose chocolat	24 h CO ₂	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i>	Croissance et β-hémolyse Croissance et β-hémolyse croissance
Milieux de recherche des décarboxylases (recouvrir d'huile stérile)	48 h	<i>S. typhimurium</i>	Positif
- Lysine	48 h	<i>S. flexneri</i>	Négatif
- Ornithine	48 h	<i>S. typhimurium</i> <i>K. pneumoniae</i>	Positif Négatif
- arginine (dihydrolase)	48 h	<i>S. typhimurium</i> <i>P. mirabilis</i>	Positif négatif
Recherche de gélatinase (méthodes rapides)	24 h	<i>E. coli</i> <i>S. marcescens</i>	Négatif positif
Milieu de Kligler (voir gélose aux trois sucres et au fer)			
Milieu de Mac Conkey	24 h	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i> <i>E. faecalis</i>	Colonies rouges Colonies incolores (pas d'envahissement) Pas de croissance
Bouillon au malonate	24 h	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Négatif (vert) Positif (bleu)
Milieu de Chapman	24 h	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli</i>	Colonies jaunes Colonies roses Pas de croissance

Milieux pour réaction au rouge de méthyle/réaction de Voges Proskauer	48 h	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Positif / négatif Négatif / positif
Milieux de Mueller Hinton	24 h	<i>E. coli</i> ATCC 25923 <i>S. aureus</i> ATCC 25923 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Dimensions des zones acceptables (voir tableau 13)
Bouillon nitraté	24 h	<i>E. coli</i> <i>A. calcaoaceticus</i>	Positif négatif
Oxydation / fermentation (OF) du glucose (sans huile)	24 h	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. calcaoaceticus</i> <i>biovar Iwoffii</i>	Oxydation sur surface Pas de changement
Eau peptonée (recherche d'indole)	24 h	<i>E. coli</i> <i>K. pneumpniae</i>	Positif négatif
Recherche de la phénylalanine désaminase	24 h	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i>	Négatif Positif

Milieu	Durée d'incubation	Micro-organisme de contrôle	Résultat attendu
Gélose salmonella-Shigella ou gélose désoxycholate-citrate	24 h	<i>E. coli</i> <i>S. typhimurium</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>E. flexeneri</i>	Pas de croissance Colonies incolores Colonies incolores Colonies incolores
Bouillon au sélénite	24 h	<i>S. typhimurium</i> <i>E. coli</i>	Croissance après repiquage Pas de croissance, après repiquage
Milieu de Simmons incubé sans visser le bouchon	48 h	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Pas de croissance Croissance, couleur bleue
Gélose TCBS	24 h	<i>Vibrio spp (non agglutinable)</i>	Colonies jaune
Bouillon au tétrathionate (comme le bouillon au Sélénite)	E. Coli	<i>E. Coli</i>	Pas de croissance
Milieu de Thayer et Martin	24 h CO ₂	<i>N. meningitidis</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus spp</i> <i>E. coli</i> <i>C. albicans</i> <i>B. fragilis</i>	Croissance Croissance Pas de croissance Pas de croissance Pas de croissance Croissance
Bouillon au thioglycolate	24 h	<i>B. freundii</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. flexneri</i> <i>A. calcoaceticus</i>	Gaz* en A/A + H ₂ S Gaz* en K/A + H ₂ S K/A* Pas de modification
Milieu à l'urée		<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i>	Négatif Positif (rose)
Milieu pour réaction de Voges-Proskauer (voir milieux pour réaction au rouge de méthyle/réaction de Voges-Proskauer)			

*** A / A : culture inclinée acide ; K / A : culture inclinée basique**

A-III-3-2 Entretien et utilisation des cultures mères

A-III-3-2-1 Sélection et origine

Sélectionner les souches de façon à pouvoir tester le maximum de caractéristiques morphologiques, métaboliques et sérologiques avec le maximum de cultures. Une liste de souches est proposée au tableau II.

On peut les obtenir en faisant appel à différentes sources:

- Isolements correctement documentés réalisés à partir de prélèvements cliniques
- Collections de cultures officielles
- Producteurs du commerce
- Enquêtes d'évaluation externe de la qualité
- Laboratoires de référence

A-III-3-2-2 Conservation

A-III-3-2-2-1 Conservation à long terme

Les méthodes de conservation à long terme permettent d'attendre des mois, voir des années, entre les divers repiquages. Les méthodes les meilleures sont la lyophilisation ou la conservation à une température égale ou inférieure à -70°C dans un congélateur électrique ou dans l'azote liquide.

Les autres méthodes sont décrites ci-dessous.

1- Glycérol à -20°C

- Faire une culture pure sur un milieu solide approprié
- Lorsque la culture est entièrement développée, la recueillir à l'aide d'une anse
- Mettre en suspension de petits morceaux de culture dans du glycérol neutre stérile.
- Répartir dans des tubes ou flacons à bouchons vissés en portion de 1 à 2ml.
- Conserver à -20°C .

- Eviter les congélations et les décongélations successives.
- Transvaser au bout de 12 à 18 mois.

2- Huile minérale à température ambiante

- Préparer des tubes de gélose inclinée à l'infusion de cœur. Pour les germes exigeants, ajouter du sang frais non dénaturé ou du sang cuit.
- Stériliser l'huile minérale huile de vaseline à l'air chaud (170°C pendant 1 heure).
- Faire pousser une culture pure sur la gélose inclinée.
- Lorsque l'on observe un bon développement, ajouter de l'huile de vaseline stérile jusqu'à environ 1cm au dessus du sommet de la pente.
- Repiquer lorsque c'est nécessaire en recueillant une partie de la culture sous huile.
- Conserver à température ambiante.
- Transvaser au bout de 6 à 12 mois.

3- Culture en piqûres à température ambiante (employées uniquement pour les germes non exigeants, tels que les staphylocoques et les entérobactériacées)

- Préparer des tubes en y coulant une bonne épaisseur de gélose sans glucide. Les milieux à base de gélose trypticase-soja sont recommandés.
- Piquer le germe dans la gélose
- Incuber jusqu'au lendemain à 35°C
- Renfermer le tube avec une capsule vissée ou un bouchon
- Tremper la capsule ou le bouchon dans la paraffine fondue pour les sceller
- Conserver à température ambiante
- Transvaser au bout d'un an

4- Culture en piqûres dans du milieu cystine trypticase agar (CTA) (pour Neisseria et Streptocoques)

- préparer des tubes de milieu de base CTA
- piquer le germe dans le milieu
- incubé jusqu'au lendemain à 35°C
- Renfermer le tube à l'aide d'une capsule vissée ou d'un bouchon
- Tremper la capsule ou le bouchon dans de la paraffine fondue pour les sceller
- Pour Neisseria, conserver à 35°C et transvaser toutes les deux semaines . Pour les streptocoques, conserver à température ambiante et transvaser une fois par mois.

5- Milieu à l'extrait de viande cuite pour germes anaérobies

- Ensemencer les tubes
- Incuber jusqu'au lendemain à 35°C
- Refermer le tube à l'aide d'une capsule vissée ou d'un bouchon

- Conserver à température ambiante
- Transvaser tous les deux mois

A-III-3-2-2-2 Conservation à court terme

Les cultures de travail destinées aux tests de routine quotidiens peuvent être préparées de la manière suivante

1) Germes à croissance rapide

- Les ensemercer sur de la gélose au sang inclinée, dans des tubes à bouchon vissé
- Incuber jusqu'au lendemain à 35 °C
- Conserver au réfrigérateur
- Transvaser toutes les deux semaines

2) Streptocoques

- Les ensemencer sur de la gélose au sang inclinée, dans des tubes à bouchon vissé
- Incuber jusqu'au lendemain à 35 °C
- Conserver au réfrigérateur
- Transvaser toutes les deux semaines

3) Méningocoques et Haemophilus

- Les ensemencer dans des tubes de gélose chocolat inclinée, des boîtes
- Incuber jusqu'au lendemain à 35 °C
- Conserver à température ambiante
- Transvaser deux fois par semaine

4) Gonocoques

- Les ensemencer sur de la gélose chocolat
- Incuber jusqu'au lendemain à 35 °C
- Transvaser tous les deux jours
- Remplacer la souche de contrôle de la qualité par chaque nouvel isolement clinique

A-III-3-2-3 Recours au laboratoire de référence (6)

Les catégories de prélèvements devant être adressées à un laboratoire de référence régional ou central sont les suivantes :

- * Les prélèvements pour des tests rarement demandés ou hautement spécialisés (par exemple Virologie, Sérodiagnostic des infestations parasitaires).
- * Les prélèvements en double, de temps à autre, pour vérifier les résultats du laboratoire qui les envoie.
- * Les prélèvements nécessitant une confirmation, une spécification, un groupage ou un typage de germes pathogènes très importants en santé publique, par exemple *Salmonella* , *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Brucella*, méningocoques et pneumocoques.

Les laboratoires de référence devront pouvoir fournir des cultures de référence pour le contrôle de la qualité et les besoins de la formation, ainsi que des sérums et réactifs étalons pour établir des comparaisons avec ceux utilisés dans les laboratoires périphériques.

S'il n'existe aucun programme d'évaluation externe de la qualité, il faudra demander au laboratoire de référence de fournir des prélèvements et des cultures anonymes codés de façon que le laboratoire puisse tester sa propre capacité d'isolement et d'identification.

A-III-3-3 Colorants et Réactifs

Les recommandations relatives à la vérification d'un certain nombre de réactifs figurent dans le tableau IV. Ces vérifications doivent être effectuées :

- chaque fois que l'on prépare un nouveau lot de solution de travail :
- une fois par semaine (c'est capital pour le colorant froid de Ziehl Neelsen: le colorant classique a une durée de conservation de plusieurs mois)

Les colorants et réactifs doivent être jetés lorsque :

- la date limite d'utilisation spécifiée par le fabricant est dépassée ;
- des signes visibles de détérioration apparaissent (trouble, précipité, changement de couleur).

Tableau 4- Epreuves d'efficacité appliquées aux réactifs couramment employés

Espèces pouvant être testés			
Réactif ou colorant	positif	négatif	milieu
Disque à la bacitracine	<i>S. pyogenes</i> (zone)	<i>E. faecalis</i>	Gélose au sang
Catalase	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	TSA
Plasma pour la recherche de la coagulase	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	TSA
β -glucuronidase (PGUA)	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	TSA
colorant de Gram	<i>Staphylococcus</i>	<i>E. coli</i>	Mélangé au frottis
ONPG	<i>S. marcescens</i>	<i>S. typhimurium</i>	Gélose aux trois sucres et au fer ou milieu de Hajna-kliger
Disque à l'optochine	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. mitis</i>	Gélose au sang
Oxydase	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	TSA
Disque au tellurite	<i>E. faecalis</i> (pas de zone)	<i>S. agalactiae</i> (zone)	Gélose au sang
Facteur V (disques ou bandelettes)	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. influenzae</i>	TSA
Facteur XV (disques ou bandelettes)	<i>H. influenzae</i>	<i>Flore mixte non acido-résistante</i>	TSA
Colorant de Ziehl- Neelsen	<i>M. tuberculosis</i>		Frottis de crachats

A-III-3-4 Antigènes et immunsérums à usage diagnostique

Pour obtenir les meilleurs résultats avec les antigènes et les immunsérums :

- Toujours suivre les instructions du fabricant
- Les conserver à la température demandée. Certains réactifs sérologiques ne supportent pas la congélation.
- Eviter les congélations et les décongélations successives. Avant congélation, diviser l'immunsérum en portions suffisantes pour quelques tests .
- Les jeter lorsque la date limite d'utilisation spécifiée par le fabricant est dépassée.
- Pour tester les immunsérums agglutinants, toujours utiliser des cultures pures, fraîches de réactivité connue.
- Toujours inclure un sérum témoin de réactivité connue dans chaque lot de tests. Ce sérum peut provenir d'un malade ou être acheté dans le commerce .
- Si possible, l'activité du sérum témoin doit être exprimée en unités internationales par ml.
- Des sérums appariés provenant d'un même malade, prélevés au cours des phases aiguë et de convalescence de la maladie, devront être testés avec le même lot de réactifs.
- Pour le diagnostic sérologique de la syphilis, on n'emploiera que des méthodes reconnues au niveau national ou international.
- Chaque lot de tests sérologiques devra comprendre :
 - un sérum négatif (témoin de spécificité)
 - un sérum faiblement réactif (témoin de sensibilité)
 - un sérum très réactif (témoin de titrage), dont le dernier titrage doit donner un résultat qui se situe à une dilution près de son titre exact.

- Toujours noter tous les titres des sérums témoins.

A-III-3-5 Tests de sensibilité aux antibiotiques

Il est recommandé d'utiliser la méthode de Kirby-Bauer modifiée en routine. Pour éviter toute erreur, se conformer aux indications suivantes:

- Les disques doivent avoir le bon diamètre (6,35mm)
- L'activité des disques doit être bonne
- Les réserves de produits doivent être conservées à l'état congelé (-20°C).
- Les produits utilisés ne seront pas conservés plus d'un mois au réfrigérateur (2-8°C)
- N'utiliser que du milieu de Mueller Hinton dont l'efficacité a été testée.
- Pour certains antibiotiques, il est indispensable que le milieu fini ait un pH correct (7,2 :7,4)
- L'inoculum devra être étalonné d'après l'étalon de turbidité prescrit
- On mesurera exactement les dimensions de la zone d'inhibition.
- Ces dimensions seront interprétées par comparaison avec un tableau des diamètres critiques. Pour chaque germe à tester, le diamètre de la zone doit s'inscrire dans les limites données.
- Seules des cultures pures de bactéries à croissance rapide donnent des résultats fiables.
- Les trois souches de référence sont les suivantes :
 - *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 : NCTC 6571)
 - *Escherichia coli* (ATCC 25922 : NCTC 10418)
 - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 : NCTC 10622)
- Les tests seront pratiqués à l'aide des trois souches de référence
 - lorsqu'on commence un nouveau lot de disques
 - lorsqu'on commence un nouveau lot de milieux
 - une fois par semaine, en parallèle avec les antibiogrammes de routine
- utiliser la fiche de contrôle de la qualité pour noter les résultats des tests d'efficacité et les évaluer.

A-IV Evaluation externe de la qualité

On trouvera dans cette section des informations relatives à ce qu'implique la participation à un système d'évaluation externe de la qualité (parfois appelé "système d'évaluation des compétences").

A-IV-1 Objectifs

Les objectifs d'un programme d'évaluation de la qualité sont les suivants : (1)

- Donner l'assurance aux médecins et au grand public que le diagnostic de laboratoire est de bonne qualité.
- Evaluer et comparer la fiabilité des résultats de laboratoire à l'échelle nationale.
- Identifier les erreurs communes.
- Encourager l'utilisation de méthodes uniformisées.
- Favoriser l'usage de réactifs normalisés.
- Prendre des sanctions administratives (pouvant comprendre l'annulation de la licence d'exercice) contre les laboratoires ne satisfaisant pas aux normes.
- Stimuler la mise en œuvre de programmes de contrôle interne de la qualité.

A-IV-2 Organisation

Un programme d'évaluation de la qualité comporte un certain nombre d'enquêtes au cours desquelles des prélèvements codés sont adressés par la poste aux laboratoires participants.

Ces prélèvements doivent être incorporés dans les examens de routine du laboratoire et manipulés et testés exactement de la même façon que les prélèvements cliniques habituels.

Les enquêtes doivent être menées conformément aux recommandations suivantes:

- L'idéal serait de faire 12 enquêtes par an, mais 4 peuvent suffire.
- Chaque enquête doit comporter au minimum 3 prélèvements.
- La période allouée pour l'examen doit être courte, par exemple une semaine après réception du prélèvement.
- Chaque enquête devra comporter des instructions et de

formulaire de réponse. La feuille de réponse doit comporter un double et porter la date limite de réponse bien en évidence.

A-IV-3 Cultures

Il faut inclure des cultures dans le programme d'évaluation externe de la qualité pour l'identification et les tests de sensibilité à un nombre limité d'antibiotiques : il peut s'agir de cultures pures ou de mélanges de deux ou plusieurs cultures.

Ces cultures doivent appartenir au moins aux 3 premières des 5 catégories suivantes:

1. Espèces bactériennes ayant une grande importance en santé publique, mais que l'on n'observe pas souvent dans la pratique habituelle, par exemple *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella paratyphi A*.

NB : *Brucella* et *Salmonella typhi* ne doivent pas être employées dans les systèmes d'évaluation de la qualité, car elles peuvent être à l'origine d'infections accidentelles graves.

2. Des biotypes anormaux souvent mal identifiés, par exemple: *Escherichia coli* H₂S-positif. *E.coli* lactose-négatif et *Proteus* Uréase-négatif.

3. Des germes opportunistes ou récemment identifiés, par exemple: *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas cepacia*.

4. On peut utiliser un mélange de *Shigella*, *Citrobacter*, *E. coli* et *Klebsiella* pour tester l'aptitude d'un laboratoire à isoler des germes pathogènes au milieu d'un certain nombre de micro-organismes commensaux.

5. On peut utiliser un mélange de micro-organismes non pathogènes pour tester l'aptitude à reconnaître les prélèvements négatifs.

A-IV-4 Sérums

Un programme d'évaluation externe de la qualité doit comprendre les tests sérologiques utilisés pour dépister les infections suivantes:

- Syphilis
- Toxoplasmose
- Rubéole
- Brucellose

- Hépatite
- Infections à Streptocoques
- Typhoïde (test de Widal lorsqu'il est encore employé en routine)
- Infection à VIH

A-IV-5 Appréciation et Notification des résultats

Dès que l'on a reçu tous les rapports des laboratoires participants, on leur envoie les réponses correctes. Dans le mois qui suit, on leur envoie un rapport définitif avec analyse des résultats. Une note est attribuée à chaque laboratoire. 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.

B-I DEFINITIONS

Pour être de bonne qualité, un test diagnostique doit être cliniquement utile, c'est à dire qu'il doit aider à prévenir ou à traiter une maladie.

Les autres caractères de qualité d'un test diagnostique sont les suivants:

- La fiabilité : le résultat est-il correct ?
- La reproductibilité : obtient-on le même résultat lorsqu'on répète le test ?
- La rapidité : le test est-il suffisamment rapide pour être utile au médecin dans la prescription du traitement ?
- Le rapport coût-avantage : le coût du test est-il raisonnable au regard des avantages qu'il présente pour le malade et la communauté ?

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 . Elle doit être :

- exhaustive, afin de couvrir chaque étape du cycle , depuis le prélèvement des échantillons jusqu'à l'envoi du rapport au médecin.
- rationnelle, pour se concentrer sur les étapes les plus importantes de l'analyse.
- régulière, afin d'assurer une vérification continue de méthodes utilisées.

fréquente , pour déceler et corriger les erreurs au fur et à mesure.

B-II MATERIEL ET METHODES

B-II-1 Matériel

L'entretien de ce matériel d'étude est particulièrement important au sein du laboratoire. On ne peut effectuer des tests de bonne qualité si le matériel utilisé est de mauvaise qualité ou mal entretenu.

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

B-II-2 Méthodes

Pour un fonctionnement correct, chaque laboratoire doit disposer d'un manuel pratique contenant les rubriques suivantes :

- Nettoyage du plan de travail.
- Hygiène personnelle
- Séparation entre zone de travail et secteurs où l'on mange et où l'on fume
- Mesures de sécurité
- Manipulation et élimination du matériel infecté
- Vaccinations appropriées
- Entretien du matériel
- Prélèvements
- Enregistrement des prélèvements
- Elimination des prélèvements défectueux
- Traitement des prélèvements
- Enregistrement des résultats
- Transmission des résultats

Ce manuel pratique doit être scrupuleusement suivi et régulièrement révisé et mis à jour.

L'assurance de la qualité permet de faire en sorte que les tests onéreux soient utilisés de façon aussi économique que possible .Elle détermine également si les nouveaux tests sont intéressants ou non , permet d'améliorer les résultats des laboratoires cliniques et de santé publique et autorise la comparaison des résultats obtenus dans différents laboratoires.

En effet il existe deux types d'assurance de la qualité.

B-II-2-1 L'assurance interne de la qualité :

Elle est appelée **CONTROLE DE LA QUALITE**. Cela signifie que chaque laboratoire a un programme de vérification de la qualité de ses propres tests.

Le contrôle interne de la qualité comprend théoriquement :

- Une surveillance continue de la qualité des tests.
- Une vérification complète à chaque étape , depuis le prélèvement de l'échantillon (dans la mesure du possible) jusqu'à la remise du rapport.

Les laboratoires ont une responsabilité éthique vis à vis du malade et doivent fournir des résultats exacts et informatifs.

B-II-2-2 L'assurance externe de la qualité : (8)

Elle est appelée **EVALUATION DE LA QUALITE**. Cela signifie que les résultats du laboratoire sont contrôlés par un organisme extérieur. Dans certains pays, cette participation est obligatoire (et réglementée par le gouvernement) et indispensable pour obtenir la licence d'exercice.

L'évaluation externe de la qualité comprend :

- La surveillance périodique de la qualité des tests
- La vérification ponctuelle des tests d'identification, et parfois des techniques d'isolement.

• B-II-3 Critères de qualité en microbiologie

B-II-3-1 Intérêt clinique

Pour un test microbiologique , un critère important de qualité est la mesure dans laquelle il contribue à la prévention ou à la guérison des maladies infectieuses ; c'est ce qu'on appelle son intérêt clinique.

L'intérêt clinique ne peut être attesté que lorsque la communication entre le clinicien et le laboratoire est bonne.

En résumé , un test de bonne qualité est un test exact et qui donne des résultats utiles pour la prévention ou le traitement de l'infection. Il n'est pas nécessaire d'isoler ni d'identifier tous les types de micro-organismes présents dans le prélèvement.

B-II-3-2 Fiabilité

On mesure la fiabilité des tests donnant des résultats quantitatifs, d'après l'écart que ces derniers présentent par rapport à la valeur réelle .

Voici quelques exemples de tels tests:

- Dosage sérique des antibiotiques
- Mesure des valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques in vitro.
- Dosage sérique des anticorps

On mesure la fiabilité des tests donnant des résultats qualitatifs en voyant si le résultat est correct. Voici des exemples de tels tests:

- Identifier des germes pathogènes
- Tests de sensibilité aux antibiotiques d'un isolement par la méthode des disques.

Il est indispensable d'utiliser une terminologie pour les micro-organismes afin de garantir la fiabilité des résultats . On emploiera toujours la nomenclature internationale reconnue.

Par exemple:

Staphylococcus aureus et non "Staphylocoque pathogène" *Streptococcus pyogenes* et non "Streptocoque hémolytique"

Il est indispensable d'employer des méthodes uniformisées et approuvées. Par exemple, les tests de sensibilité à l'aide de disques imprégnés doivent être effectués selon une technique reconnue au plan international, comme la méthode de Kirby Bauer modifiée.

B-II-3-3 Reproductibilité

Deux facteurs peuvent diminuer la reproductibilité ou la précision d'un test microbiologique:

- le manque d'homogénéité : un prélèvement unique provenant d'un malade peut contenir plus d'un germe. Des mises en culture répétées peuvent par conséquent entraîner l'isolement de différents micro-organismes.
- Le manque de stabilité: Avec le temps , les germes présents dans le prélèvement se multiplient ou meurent à des vitesses différentes. Les cultures répétées peuvent par conséquent entraîner l'isolement de différents micro-organismes. Pour améliorer la précision, il faut donc tester les prélèvements le plus tôt possible.

B-II-3-4 Efficacité

L'efficacité d'un test microbiologique est sa capacité à permettre de diagnostiquer correctement un germe pathogène ou une affection pathologique.

Deux critères permettent de la mesurer:

B-II-3-4-1 Sensibilité :

$$\text{sensibilité} = \frac{\text{nombre total de résultats positifs}}{\text{nombre total de malades infectés.}}$$

Plus un test est sensible, moins on obtient de faux-négatifs.

B-II-3-4-2 Spécificité :

$$\text{Spécificité} = \frac{\text{nombre total de résultats négatifs}}{\text{nombre total de sujets non infectés .}}$$

Plus un test est spécifique, moins on obtient de faux-positifs.

La sensibilité et la spécificité d'un test sont intimement liées. En changeant ses critères de limitation, on peut augmenter la sensibilité d'un test aux dépens de sa spécificité, et vice versa.

Pour la réalisation de cette troisième partie, nous nous sommes inspirés sur ce travail qui a été effectué au laboratoire de Bactériologie de l'H.A.L.D. et qui est intitulé « Infections respiratoires basses communautaires », dont voici le plan détaillé : (4)

C-I Prélèvements

C-I-1 Conditions de réalisation des prélèvements

Dans ces conditions, le respect des règles d'asepsie, de stérilité doivent être de rigueur. La qualité des prélèvements conditionne la suite de l'analyse et la valeur des résultats.

En général un seul prélèvement ne suffit pas c'est ainsi qu'après le prélèvement du premier jour (J₁), un autre prélèvement bactériologique de contrôle a été réalisé à J₁₀.

C-I-1-1 Sécrétions trachéo-bronchiques : les expectorations

Ce type de prélèvement exige une condition qui est celle de la nécessité d'un effort de toux. En outre ce prélèvement doit être effectué à jeûn, en dehors de tout traitement antibiotique et après nettoyage buccal avec de l'eau physiologique.

C-I-1-2 Sécrétions rhino-pharyngées

Contrairement aux expectorations qui ont été recueillies chez les adultes et les grands enfants (de plus de 5 ans) dans une petite boîte stérile de 50ml, celles-ci par contre ont été recueillies chez les nourrissons et les enfants de moins de 5 ans chez qui il est difficile d'obtenir un effort de toux. On procède ainsi par aspiration au niveau du rhino-pharynx à l'aide d'une seringue de gavage au bout de laquelle est adapté un embout de 100µl.

C-I-1-3 Hémoculture

Chez les patients nécessitant cet examen, ce type de prélèvement doit être réalisé également en dehors de toute antibiothérapie, loin des repas et au moment des pics fébriles.

Après un nettoyage minutieux du pli du coude, une ponction veineuse d'environ 10ml de sang (chez l'adulte), 5ml de sang (chez l'enfant), est effectuée à l'aide d'une seringue.

Le sang doit être immédiatement inoculé dans le ballon d'hémoculture, celui-ci également devant être immédiatement acheminé au laboratoire.

C-I-2 Transport des prélèvements

Les expectorations et sécrétions rhino-pharyngées ont été transportées au laboratoire comme il se doit dans une glacière contenant des réfrigérants.

Ces prélèvements acheminés au laboratoire sont pris en charge dans un délai de quatre heures car la flore commensale d'accompagnement se multiplie rapidement, ce qui peut fausser les résultats.

De plus certains agents infectieux sont extrêmement fragiles.

C-I-3 Conservation des prélèvements

Comme nous l'avions annoncé précédemment, certains prélèvements sont réalisés en double pour chaque patient en vue de la conservation de l'échantillon non utilisé, et cette conservation se fait à -70°C .

Elle se justifie lorsque l'on veut revenir sur certains prélèvements notamment pour confirmer ou infirmer un résultat douteux.

La décongélation se fait à la température ambiante au laboratoire.

C-II Examen macroscopique

Il consiste à l'appréciation de l'aspect des prélèvements. Par exemple dans le cas de l'aspect de l'expectoration :

- une expectoration purulente ou mucopurulente est appropriée aux investigations bactériologiques.
- Une expectoration spumeuse est un prélèvement impropre à l'analyse bactériologique et dans ce cas doit être rejeté.

C-III Traitement des sécrétions trachéo-bronchiques

C-III-1 Cas des sécrétions trachéo-bronchiques

- Laver l'expectoration avec de l'eau physiologique stérile
- Retirer complètement l'eau de lavage
- Ajouter un volume égal de N-acétyl cystéine 1% (MUCOMYST[®]) ou utiliser un volume égal de digesteur EURO[®] (ce qui correspond à une dilution au 1 / 2).
- Mélanger au vortex deux minutes et laisser reposer dix à quinze minutes,

- Faire une dilution au 1 / 500 avec de l'eau physiologique stérile (à l'aide d'une anse calibrée, prélever 10µl d'homogénéisation et diluer dans 5ml d'eau),
- Homogénéiser

Remarque :

Réaliser le frottis destiné à la coloration au bleu de méthylène avant d'ajouter le N-acétylcystéine car ce dernier digère les cellules.

C-III-2 Cas des sécrétions rhinopharyngées

Diluer au 1 / 1000 avec de l'eau physiologique (diluer 10µl de prélèvement dans 10ml d'eau physiologique) .

C-IV Examen après coloration au Gram et / ou bleu de méthylène

A partir du produit pathologique préalablement traité, on réalise deux frottis l'un coloré au Gram, l'autre coloré au bleu de méthylène .

L'examen microscopique à l'objectif x 100 permet d'apprécier :

- le nombre de polynucléaires
- l'aspect de la flore
- le nombre de cellules épithéliales.

Le rapport nombre de polynucléaires sur nombre de cellules épithéliales (2 pour un prélèvement acceptable) permet de distinguer différentes situations (schéma 1).

L'examen microscopique est une étape incontournable du diagnostic car non seulement elle permet de juger de l'acceptabilité du prélèvement, mais elle sert surtout à orienter les investigations grâce à l'aspect de la flore.

Cellules épithéliales pharyngées	< 25 / champ	> 25 / champ
--	--------------	--------------

Leucocytes	< 25 / champ	>25/champ
------------	--------------	-----------

Flore bactérienne au Gram	Polymor- phe	Monomor- phe ou nette prédomi- nance d'un type
---------------------------------	-----------------	---

Culture sans
signification

Procéder à l'ensemencement

Prélèvement impropre
à l'analyse
bactériologique :
présence de salive

**Schéma 1 : Critères d'acceptation des sécrétions
trachéo-bronchiques ou rhinopharyngées**

C-V Isolement

C-V-I Ensemencement

Une petite quantité d'échantillon seraensemencée sur les milieux recommandés à l'aide d'une anse en platine.

NB : Les milieux d'isolement ont été égalementensemencés à partir d'une hémoculture positive.

C-V-2 Milieux utilisés

En réalité, ces milieux doivent subir un test de stérilité. Pour cela il faudra les faire passer à l'étuve pendant 24 heures, et normalement il ne doit pas y avoir de colonies.

Une chose non moins importante à retenir également est que ces milieux doivent être validés en y faisant pousser les souches de référence respectives. En vue maintenant d'obtenir des colonies des germes recherchés, les prélèvements doivent êtreensemencés sur des milieux appropriés, et incubés dans des conditions précises. Pour *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*, on parle ainsi de milieux sélectifs.

Tableau VI : Conditions de culture de *Streptococcus pneumoniae*, et *Branhamella catarrhalis*.

Bactéries	Produits pathologiques	Milieux de culture	Modalités d'incubation
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Expectorations et sécrétions rhinopharyngées	- GSC + Gentamicine à 6µg/ml	37°C + 5% de CO ₂ pendant 24 à 48 heures
	Hémoculture	Bouillon cœur-cerveille en flacon 100ml (adulte) flacon 50ml (enfant)	37°C au moins 10 jours
<i>Haemophilus influenzae</i> ou <i>Parainfluenzae</i>	Expectorations et Sécrétions rhino-pharyngées	- GSC + bacitracine à 300 mg/ml	35 à 37°C à 7% CO ₂ pendant 24 à 48 heures
	Hémoculture	Bouillon cœur-cerveille	37°C pendant 24 à 48 heures

<i>Branhamella</i> <i>catarrhalis</i>	Expectorations et sécrétions rhino- pharyngées	- Gélose chocolat avec supplément polyvitaminique	36°C + 5 à 10% CO ₂ au moins à 48 heures
	Hémoculture	Bouillon cœur-cervele	37°C au moins 10 jours

C-V-3 Incubation

Pour éviter les souillures durant l'incubation, un certain nombre de critères doivent être respectés :

- l'étuve doit être propre
- ne pas l'ouvrir trop longtemps
- la jarre d'incubation doit être stérile, et enfin :
- changer de jarre régulièrement

C-V-4 Interprétation

Pour les expectorations qui sont potentiellement contaminées par la flore salivaire, de même que pour les sécrétions rhino-pharyngées, on ne peut affirmer que la culture est positive qu'après dénombrement du nombre de bactéries par ml. Car au nombre de colonies observées sur les milieux de culture doit correspondre la quantité de bactéries par ml de sécrétions (tableau VII)

Tableau VII : Corrélation entre le nombre de colonies observées sur les milieux de culture (après dilution au 1 / 2 par le digesteur puis 1/1000 ensemencement d'une anse de 10µl) et le nombre de bactéries par ml de crachats [].

--	--

Nombre de colonies sur les boîtes	Nombre de bactéries / ml de sécrétions
Moins de 5 colonies	Entre 10^5 et 10^6
De 5 à 50 colonies	Entre 10^6 et 10^7
De 50 à 500 colonies	Entre 10^7 et 10^8
Plus de 500 colonies	De 10^8 et au delà

C-VI Identification des bactéries

Pour cela on se sert uniquement de *Streptococcus pneumoniae* pour servir d'exemple d'illustration *Streptococcus pneumoniae*

- Examen macroscopique des colonies

Cet examen doit être en corrélation avec la morphologie de la flore observée à l'examen microscopique du prélèvement.

Pour cela, les colonies de pneumocoques doivent être petites, transparentes, rondes et développer une hémolyse de type alpha (alpha-viridans).

- Test de sensibilité à l'optochine

Streptococcus pneumoniae est généralement sensible à l'optochine (chlorhydrate d'éthyl hydrocupréine) alors que les autres streptocoques et en particulier les streptocoques non groupables alpha-hémolytiques ne le sont pas.

Ce test est très faible et d'une grande valeur diagnostique, mais au préalable il faudra procéder à la validation du lot de disques d'optochine en utilisant la souche de référence qui doit être bien évidemment sensible à l'optochine.

- Microgalerie CSB Strepto

Là également il faudra procéder à la validation des galeries toujours avec la souche de référence.

Ce deuxième test permet de faire un diagnostic différentiel des Streptocoques viridans.

C-VII Détermination de la sensibilité aux antibiotiques : par l'antibiogramme standard ou diffusion en milieu gélosé.

L'antibiogramme apprécie la modification de la croissance d'une souche bactérienne en présence d'antibiotique. La croissance bactérienne se traduit par la variation de paramètres diversement quantifiables.

Pour les trois germes concernés (*Streptococcus pneumoniae* ; *Haemophilus influenzae* ; *Branhamella catarrhalis*), l'antibiogramme standard a été réalisé sur gélose au sang cuit.

Mais auparavant il faudra valider chaque série de test avec la souche de référence, et que le choix des antibiotiques soit de mise car les antibiotiques testés différent selon chaque germe.

Pour la réalisation de l'antibiogramme, il faudra procéder de la manière suivante :

- Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 18h à 24heures, préparer une suspension de 1 à 2 colonies dans 100ml d'eau physiologique. Ajuster l'opacité équivalente à celle produite par le tube 0,5 de la gamme de Mac Farland (concentration de 10^6 bactéries /ml ou 10^6 UFC / ml). L'inoculum ainsi préparé est dilué au 1/ $10^{\text{ème}}$.

- Ensemencement et application des disques

Ensemencer les boites contenant les milieux par inondation (aspirer l'excès) puis laisser sécher 10 à 15mn à la température ambiante.

Appliquer les disques d'antibiotiques correspondant à l'aide des distributeurs ou à la pince en appuyant légèrement. Les antibiotiques testés différent selon chaque germe comme précédemment annoncé
(voir tableau VIII).

Incuber à 37°C pendant 18 – 24 heures.

Tableau VIII : Antibiotiques testés pour chaque germe

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Branhamella catarrhalis</i>
Pénicilline G	Ampicilline	Pénicilline G
Oxacilline 1µg	Céfixime	Céfixime
Céfixime	Spiramycine	Erythromycine

Erythromycine	Pristinamycine	Spiramycine
Spiramycine	Gentamicine	Pristinamycine
Pristinamycine	Péfloxacine	Gentamicine
Gentamicine	Tétracycline	Péfloxacine
Péfloxacine	Sulfaméthoxazole / triméthoprime	Tétracycline
Tétracycline		
Rifampicine		

- Lecture de l'antibiogramme standard

Les diamètres d'inhibition se mesurent à l'aide d'une règle à coulisse puis comparés aux valeurs critiques de l'antibiotique correspondant.

- Interprétation

En fonction du diamètre de la zone d'inhibition, le germe sera dit : sensible, intermédiaire ou résistant .

C-VIII Détermination de la CMI par E-test® (Epsillometer Test)

Le E-test® est une technique de détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries. Son principe est basé sur la combinaison de deux concepts de dilution et de diffusion. Dans le mode opératoire, il faudra tenir compte des recommandations du NCCLS pour la réalisation du E-test (tableau XIII).

L'inoculum se prépare en réalisant une suspension de colonies obtenues d'une culture pure de 18 à 24 heures dans un bouillon MH pour les pneumocoques et *Branhamella catarrhalis*, dans de l'eau physiologique ou dans HTM (*Haemophilus* Test Medium) pour *Haemophilus*.

La suspension est calibrée à l'échelle 0,5 Mac Farland.

Le E-test[®] se fait de préférence dans des boîtes de Pétri de 180mm de diamètre. Ce qui permet de déposer un maximum de 6 bandes.

L'ensemencement s'effectue de préférence par écouvillonnage selon la méthode de Kirby-Bauer préconisée par le NCCLS : imbiber un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et essorer sur le rebord du tube.

Passer l'écouvillon sur toute la surface de la gélose par simple rotation de 120° s'assurer que toute la boîte est bien ensemencée.

Quant à l'application des bandes E-test[®], il convient de noter également que les antibiotiques testés par E-test[®] diffèrent selon les germes (tableau XII). Et cette application doit être réalisée de la manière la plus minutieuse possible de façon suivante :

- Sortir le paquet de bandes à utiliser du « freezer » (-20°C) et le laisser revenir à la température ambiante jusqu'à ce que toute l'humidité s'évapore avant de l'ouvrir.
- Vérifier l'absence de fentes et de trous sur les paquets de E-test[®] si un paquet est endommagé, ne pas l'utiliser.
- Retirer les bandes avec une pince par la partie supérieure où il est marqué E.
- Eviter de toucher la zone chargée à la main.
- Placer les bandes dans la cassette d'insertion des bandes. Chaque puits peut contenir 20 bandes.
- Mettre le même type d'antibiotique par puits.
- Remplir les puits de la cassette suivant l'antibiogramme de l'espèce à tester.
- Prélever bande par bande à l'aide de l'applicateur et les déposer à la surface de la gélose (après 50 bandes, changer la bande adhésive de l'applicateur).
- Incuber immédiatement les boîtes à 37°C sous une atmosphère à 5% CO₂ pendant 18 à 24 h

Remarques

- Ne pas déplacer une bande E-test[®] une fois déposée sur la gélose car la libération de l'antibiotique est instantanée.
- L'épaisseur de la gélose doit être d'environ $4 \pm 0,5$ mm.

- Ne pas déposer beaucoup de bandes E-test[®] sur une boîte de Pétri : un maximum de 6 bandes est possible.

Après 24 heures d'incubation, il faudra ainsi procéder à la lecture de la valeur de la CMI. L'inhibition de la croissance se traduit par une ellipse. Ainsi la valeur de la CMI doit correspondre au point d'insertion entre la limite de la zone d'inhibition et la bande d'E-test[®].

Il faut également noter que les bandes d'E-test[®] possèdent une condition particulière de stockage. C'est ainsi que ces paquets seront stockés au freezer à -20°C. Après ouverture d'un paquet, les bandes inutilisées doivent être gardées dans des tubes de stockage hermétique contenant un dessiccateur et placées à -20°C.

Il faut toujours s'assurer que le dessiccateur est bleu avant l'utilisation de la bande.

Marquer les tubes de stockage avec une étiquette indiquant la date de péremption, le numéro de lot et le code de l'antibiotique.

Ne stocker que le même type d'antibiotique par tube.

Quant aux critères d'interprétation, il conviendra d'avoir recours au (x) :

- calcul des CMI₅₀ et CMI₉₀ qui consiste en la détermination de la médiane par la méthode d'extrapolation linéaire.
- valeurs critiques des antibiotiques testés.

Tableau XII : Antibiotiques testés par E-test[®] pour chaque germe (bande E-test[®])

--	--	--

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Branhamella catarrhalis</i>
Amoxicilline	Amoxicilline	Amoxicilline
Amoxicilline / acide clavulanique	Amoxicilline / acide clavulanique	Amoxicilline / acide clavulanique
Céfotaxime	Céfotaxime	Céfotaxime
Vancomycine	Chloramphénicol	Chloramphénicol
Sulfaméthoxazole / triméth chloramphénicol		

Tableau XIII : Recommandations du NCCLS pour la réalisation des E-test®

Germes		Pneumocoques	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Branhamella catarrhalis</i>
Milieux		Müller Hinton Agar	Müller Hinton Agar	Müller Hinton Agar
Supplément		5 % sang de cheval défibriné	1% Isovitalex ou NAD 1% Hémoglobine	1% Isovitalex ou NAD 1% Hémoglobine
Mac Farland		0,5 -1	0,5	0,5
Incubation 35 - 37°C	Temps	20 – 24 heures	20 – 24 heures	18 – 24 heures
	atmosphère	5% CO ₂	5% CO ₂	5% CO ₂

C-IX Contrôle de qualité sur les tests de sensibilité

Il consiste à tester les souches de référence. Le développement des paramètres de contrôle de qualité, en testant des 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 du contrôle de qualité quotidien et du haut niveau de performance plusieurs laboratoires, les tests de contrôle de qualité se font maintenant plus par semaine que par jour.

Le « National Committee for Clinical Laboratories Standard (NCCLS) a publié un guide pour changer la fréquence du contrôle de qualité du jour à la semaine.

Un autre problème est la difficulté de faire le contrôle de qualité de ces tests dans lesquels une ou deux concentrations de l'antibiotique sont testées pour donner le résultat par catégorie, i. e. sensible, intermédiaire ou résistant.

De tels principes sont utilisés dans tous les tests automatisés et pour quelques antibiotiques dans les systèmes commerciaux utilisant la microdilution.

Il est difficile de développer un programme significatif de contrôle de qualité par les méthodes qui testent seulement une ou deux concentrations de l'antibiotique.

Par conséquent, c'est un domaine dans lequel un travail développé et supplémentaire est utile.

Dans cette présente étude les normes utilisées sont celles publiées par le NCCLS :

- Obtenir les souches de contrôle de qualité de source sûre (ATCC)
- Entretenir correctement les souches de contrôle de qualité en les conservant selon deux méthodes :
 - en stock culture pour l'utilisation fréquente des souches.
 - à -70°C dans les cryotubes pour une conservation à longue durée .
- Effectuer les contrôles de qualité à plusieurs niveaux :
 - par une simple vérification de la date de péremption des milieux de culture et de tout réactif à utiliser ;
 - par un stockage correct des milieux de culture, des disques et des bandes E-test® avec un relevé quotidien de la température du freezer et du réfrigérateur ;
 - par une manipulation correcte avec respect de la démarche du protocole établi ;
 - par une sélection correcte de la terminaison en pointe de la CMI ;
 - par une vérification de la profondeur de la gélose, de la capacité de croissance supportée.

C-X Recherche de la production d'une bêta-lactamase : méthode de la céfinase (méthode sensible)

Le principe de cette méthode est basé sur la détection de l'enzyme produite grâce à son habileté à hydrolyser le cycle bêta-lactame d'une céphalosporine chromogène (jaune au départ et qui vire au rouge si le cycle bêta-lactame est ouvert).

Le chromogène est la nitrocéfine qui a une grande affinité avec la plupart des bêta-lactamases. Elle est présentée sous forme de disque.

Son mode opératoire consiste à :

- déposer un disque de CEFINASE[®] sur une lame porte-objet.
- humidifier le disque à l'eau physiologique.
- prélever plusieurs colonies et déposer sur le disque.

Ainsi s'il se développe une coloration rouge, la souche est dite productrice de bêta-lactamase. Par contre si le disque reste jaune, il n'y a pas production de bêta-lactamase.

C-XI Conservation des souches bactériennes

Il existe deux méthodes qui se distinguent par la durée de survie des bactéries sous certaines conditions de conservation :

- méthodes de courte durée
- méthodes de longue durée

Quelque soit le choix, il est indispensable de suivre les impératifs qui régissent la réussite de cette manipulation. Les règles à observer sont les suivantes :

- ne conserver qu'une souche pure
- ne jamais conserver en milieu liquide pour éviter le développement de mutants,
- garder la souche dans des conditions défavorables à sa multiplication,
- éviter les repiquages et faire les subcultures sur plusieurs colonies,
- prévoir enfin toutes les mesures nécessaires pour la conservation dès l'isolement.

En outre, le matériel requis est principalement le suivant :

- milieu de conservation prêt à l'emploi
- étuve ou congélateur à -20°C ou -70°C

- et matériel divers pour ensemencement etc...

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae* et *Branhamella catarrhalis* étant des germes exigeants, notre choix se portera vraisemblablement sur les méthodes de conservation de longue durée.

Elles sont coûteuses mais préférables pour certains laboratoires. Elles réduisent de façon considérable la perte des souches gardées pendant plusieurs années et conviennent aussi à la grande majorité des bactéries.

Deux méthodes sont utilisées :

- la lyophilisation
- et la congélation à de basses températures
 - à -20°C et à -70°C
 - ou même au delà (jusqu'à -180°C) dans l'azote liquide

Les conservations par lyophilisation ou avec de l'azote liquide ne seront pas abordées ici.

Notre choix se tourne vers la congélation à -20°C et à -70°C . Une culture en phase de croissance est toujours nécessaire.

La conservation se fait dans 0,5ml d'un bouillon nutritif adapté dans un cryotube avec un inoculum de 10^8 bactéries / ml apportées par un milieu solide ou un culot de bouillon enrichi.

Les cryotubes sont alors rangés dans un portoir et immédiatement placés à -20°C et ou à -70°C . Les bactéries se conservent ainsi plusieurs années. En cas de besoin, la décongélation se fait rapidement à 37°C pendant quelques minutes.

Comme dans les autres méthodes, les milieux de conservation tiennent compte des bactéries et varient alors selon le germe (tableau XVII).

Tableau XVII : Milieux de conservation des germes

Bactéries	Milieux de conservation
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	- Sérum fœtal de veau (SVF) - Lait - Bouillon cœur-cerveille + glycérol à 10%

<i>Haemophilus influenzae</i>	- Sérum fœtal de veau (SVF) - Lait écrémé - Bouillon cœur-cerveau + glycérol à 10%
<i>Branhamella catarrhalis</i>	- Bouillon + glycérol à 10% DMSO à 10% + SVF à 10% - Lait écrémé - Bouillon cœur-cerveau + glycérol à 10%

C-XII Règles d'étiquetage

La conservation des souches se fait avec certaines règles d'étiquetage. Doivent figurer sur le tube :

- l'origine de la souche (ex : H.A.L.D ; C.H.U FANN ; H.P.D) ou le numéro de lot pour les souches de référence.
- la date de conservation
- le nom de la souche
- le numéro et la nature du prélèvement
- la température de conservation
- le milieu utilisé si possible
- le code (une lettre correspond a chaque année) si c'est adopté.

CONCLUSION

CONCLUSION

La tendance actuelle pour une meilleure efficacité économique est au regroupement des laboratoires dans lequel il y aura partage des moyens et des bénéfices. Comment avoir confiance en ses partenaires si ce n'est en respectant réciproquement les règles de l'assurance qualité ?

Plus la taille d'un laboratoire est grande, plus le personnel est nombreux, plus la direction s'éloigne de la paillasse. La mise en place d'un système qualité permet de définir les responsabilités de chacun et de déléguer efficacement son autorité.

En outre, il est important de satisfaire ses clients directs et indirects pour les fidéliser, voire développer les activités du laboratoire.

C'est dans cet ordre d'idées que le laboratoire de Bactériologie du C.H.U.

Aristide Le Dantec, dans sa vocation de recherche et de perfectionnement, s'est engagé sur ce chemin qui mène à la certification et à l'accréditation en instaurant en son service un système d'assurance qualité.

En réalité, la mise en place du système de qualité au sein de son unité de recherche a permis de valider différentes méthodes de biotechnologie microbienne et d'isoler des souches bactériennes rares ; ceci pour la première fois en Afrique

(Ex : *Moraxella catarrhalis*, *Legionelle pneumophila*).

Ainsi notre étude nous a permis d'évaluer et d'apprécier en même temps le système qualité tel qu'il est appliqué dans ce dit laboratoire, en utilisant comme référentiel normatif entre autres les BPL et de proposer par la même occasion une méthodologie à adopter en vue d'assurer la qualité des prestations.

Il ressort de cette étude que l'établissement d'une démarche d'assurance qualité n'est pas chose aisée et ne peut se concevoir aucunement de manière unilatérale.

Par conséquent il est recommandé d'impliquer tout le personnel plutôt que de le consulter en lui assurant une formation continue sur la qualité. Par la même occasion , un dialogue fructifiant et constructif doit être instauré au sein du laboratoire car un système qualité imposé pourrait ne pas être très efficace du fait d'une éventuelle réticence d'une partie du personnel.

En effet les instigateurs comme les artisans du système se doivent de dialoguer mutuellement pour parvenir à concevoir un système qualité satisfaisant et surtout applicable.

Ainsi, à la lumière de tout ce que nous venons de voir, nous pouvons mentionner et sans risque de nous tromper que mettre en place un système d'assurance qualité demande du temps, de l'énergie et crée beaucoup d'interrogations et de doutes.

Une fois en place, cependant, il facilite grandement le fonctionnement du service, les procédures sont opérationnelles et on peut le prouver.

BIBLIOGRAPHIE

1. AFNOR

Gérer et assurer la qualité,
AFNOR, Paris, 1995

2. ALBERT M.

Capitalisme contre capitalisme,
Edition du seuil, Paris, 1991

3. CEFIRA

Séminaire de formation sur les BPL,

MSAS / LNCM, 5-6 sept 2000, Dakar

4. CLEGBAZA F. S.

Streptococcus pneumoniae , Haemophilus influenzae et Moraxella catarrhalis dans les infections respiratoires basses communautaires à Dakar. Isolement bactérien et sensibilité aux antibiotiques,

Thèse Pharm, Dakar, 2000 , n°81.

5. ELSA I.

L'assurance de la qualité dans un laboratoire officiel de contrôle des médicaments,

Thèse Pharm, Marseille, 1999, n°28.

6. FEINBERG M.

L'assurance qualité dans les laboratoires Agroalimentaires et pharmaceutiques, Edition du Seuil, Paris, 1995

7. JURAN J. M.

Gestion de la qualité,

AFNOR, Paris, 1983

8. LE MONDE

Communiqué du conseil des ministres de la république française,

Paris, Avril 1992

9. NORME NF EN 45001

Critères généraux concernant le fonctionnement des laboratoires d'essais, AFNOR, Paris,

Décembre 1989

10. NORME NF EN 45002

Critères généraux concernant l'évolution des laboratoires d'essais,
AFNOR, Paris, Décembre 1989

11. NORME ISO 8402

Définition de la qualité,
Juillet 1995

12. NORME ISO 9000

Norme pour la gestion de la qualité et l'assurance de la qualité-Lignes directrices pour la
sélection et l'utilisation des normes,
Juillet 1995

13. NORME ISO 9001

Système qualité-Modèle pour l'assurance de la qualité dans les domaines de conception,
développement, production, installation et soutien après vente, Août 1994

14. NORME ISO 9002

Système qualité-Modèle pour l'assurance de la qualité en production et installation,
Août 1994.

15. NORME ISO 9003

Système qualité-Modèle pour l'assurance de la qualité en contrôle et essai finaux,
Août 1994

16. NORME ISO 9004

Gestion de la qualité et élément de système qualité-Lignes directrices,
Août 1994

17. OMS

Série des rapports techniques,
Genève, 1977, n°614, annexe 1

18. OMS

Série des rapports techniques,
Genève, 1980, n°645, annexe 2

19. OMS

Série des rapports techniques,
Genève, 1982, n°681, annexe 1

20. PHARMACOPEE INTERNATIONALE

Méthodes générales d'analyse,
OMS, Genève, 1980, troisième édition , volume 1

