

INTRODUCTION **1**

.....

Première partie : GENERALITES

I/ GENERALITES SUR LA SENSIBILITE.....

I-1 Notion de sensibilité 3

I-2 Méthodes d'étude de la sensibilité 3

.....

I-2-1 Méthode de dilution 4

.....

I-2-1-1 Sur milieu liquide 4

I-2-1-1-1 Macrodilution 4

I-2-1-1-2 Microdilution 5

I-2-1-2 Sur milieu solide 6

I-2-2 Méthode de diffusion ou Antibiogramme standard 6

I-2-3 E-test (Epsillometer-test) 7

I-3 Conditions d'application et limites des techniques d'étude de la sensibilité... 8

I-4 Résultats 9

I-4-1 Expression des résultats 9

I-5-2 Interprétation des résultats 10

I-6 Intérêt de l'étude de la sensibilité 11

II/ GENERALITES SUR L'ASSURANCE QUALITE 13

II-1 Historique 13

II-2 Concept de l'assurance qualité 14

II-2-1 Définition de la qualité 14

II-2-2	Concept de l'assurance qualité	16
II-3	Mise en place du système qualité	17
II-4	Types d'assurance qualité	19
II-4-1	Assurance qualité interne	19
II-4-2	Assurance qualité externe	20

Deuxième partie : TRAVAIL PERSONNEL

I/	MATERIEL	21
I-1	Cadre d'étude	21
I-2	Matériel	21
II/	METHODOLOGIE	22
II-1	Contrôle interne de la qualité de la sensibilité	22
II-1-1	Organisation du laboratoire	22
II-1-1-1	Exigences	22
II-1-1-2	Manuel qualité du laboratoire	23
II-1-2	Entretien du matériel	23
II-1-3	Validation des résultats des études de sensibilité :	
	utilisation des souches de référence	25
II-1-3-1	Définition des souches de référence	25
II-1-3-2	Obtention	25
II-1-3-3	Conservation	25
II-1-3-4	Régénération	25
II-1-3-5	Utilisation	27
II-1-4	Contrôle de la qualité des milieux de culture	31
II-1-4-1	Préparation	31
II-1-4-2	Contrôle de la qualité	32
II-1-4-2-1	Contrôle de la profondeur	32
II-1-4-2-2	Contrôle du pH	32

II-1-4-2-3	Contrôle de la stérilité	32
II-1-4-2-4	Contrôle de l'efficacité	33
II-1-4-3	Conservation des milieux	33
	préparés.....	
II-1-5	Contrôle de la qualité de l'inoculum	34
II-1-6	Autres contrôles	34
II-1-7	Documentation	36
II-1-8	Audit	37
II-2	Contrôle externe de la qualité de la sensibilité	37
II-2-1	Souches testées.....	38
II-2-2	Profil de sensibilité aux antibiotiques.....	38
II-2-3	Recherche de bêta-lactamase.....	42
II-2-4	Références utilisées pour les valeurs critiques.....	42
III/	RESULTATS	43
III-1	Contrôle interne de la qualité de la sensibilité.....	43
III-1-1	Résultats des contrôles effectués.....	43
III-1-2	Figures résultant des contrôles de qualité.....	44
III-2	Contrôle externe de la qualité de la sensibilité.....	45
III-2-1	Souches testées.....	45
III-2-2	Profil de sensibilité aux antibiotiques.....	45
III-2-3	Recherche de bêta-lactamase.....	52
IV/	DISCUSSION	53
IV-1	Contrôle interne de la qualité de la sensibilité.....	53
IV-1-1	E-test.....	53
IV-1-2	Les souches de référence	55
IV-2	Contrôle externe.....	57
IV-2-1	Méthodes utilisées.....	57
IV-2-2	Profil de sensibilité aux antibiotiques.....	58
	CONCLUSION	63
	BIBLIOGRAPHIE	67

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

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

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

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

I/ GENERALITES SUR LA SENSIBILITE

I-1 NOTION DE SENSIBILITE

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

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

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

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

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

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

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

Plusieurs méthodes concourent à sa réalisation :

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

I-2-1 Méthodes de dilution

I-2-1-1 Sur milieu liquide

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

❖ Principe

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

❖ Lecture

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

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

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

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

❖ Principe

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

❖ Lecture

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

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

I-2-1-2 Sur milieu solide

❖ Principe

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

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

❖ Lecture

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

I-2-2 Méthode de diffusion ou antibiogramme standard

❖ Principe

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

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

❖ Lecture

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

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

❖ Principe

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

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

❖ Lecture

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

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

- conditions d'application

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

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

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

- Limites

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

I-4 RESULTATS

I-4-1 Expression des résultats

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

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

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

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

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

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

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

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

Trois zones sont définies par rapport à la CMI :

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

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

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

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

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

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

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

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

Une souche de sensibilité intermédiaire est une souche pour laquelle le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un

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

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

Remarque :

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

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

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

II/ GENERALITES SUR L'ASSURANCE QUALITE

II-1 HISTORIQUE [11]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

II-2 CONCEPT DE L'ASSURANCE QUALITE

II-2-1 Définition de la qualité

Une définition internationale de la qualité, claire et admise par tous, est fournie par la norme ISO 8402 (la norme 8402 forme avec la norme 9000 version 1994 la norme 9000 version 2000) et reprise par l'association française de normalisation (**AFNOR**) sous la référence NFX 50 – 109 : « la qualité est l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou d'un service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire les besoins implicites et explicites d'un client »[1, 9, 16, 20, 29].

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

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

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

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

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

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

II-2-2 Concept de l'assurance qualité

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

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

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

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

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

Le système qualité est l'ensemble de la structure organisationnelle, des responsabilités, des procédures et des ressources pour mettre en œuvre

la gestion de la qualité. Elle regroupe les moyens pratiques et concrets de gestion de la qualité.

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

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

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

II-3 MISE EN PLACE DU SYSTEME QUALITE

Selon le guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale, «tout laboratoire réalisant des analyses de biologie médicale doit disposer d'un système d'assurance de qualité basé sur des procédures opératoires écrites concernant les différentes étapes de l'analyse et les conditions de son exécution . Un système d'assurance de qualité doit être permanent et prévoit une trace des contrôles effectués. Sans cette trace, il est difficile, et parfois impossible, de retrouver une erreur et/ou d'en analyser les causes pour en éviter la répétition. Le système d'assurance de qualité du laboratoire est placé sous la responsabilité du biologiste ... »[23].

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

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

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

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

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

II-4 TYPES D'ASSURANCE QUALITE

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

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

II-4-1 Assurance interne de la qualité

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

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

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

II-4-2 Assurance externe de la qualité

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

I/ MATERIEL

I-1 CADRE D'ETUDE

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

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

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

I-2 MATERIEL

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

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

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

II/ METHODOLOGIE

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

II-1 CONTROLE INTERNE DE LA QUALITE

II-1-1 Organisation du laboratoire

II-1-1-1 Exigences

Un programme de contrôle interne de la qualité doit être :

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

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

II-1-1-2 Manuel qualité du laboratoire

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

II-1-2 Entretien du matériel

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

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

Tableau I : **Contrôle de la qualité du matériel**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- *Lire la notice de la souche fournie par le fabricant ; celle-ci doit être considérée comme spécifique de la souche donnée.*
- *Réunir tous les matériels et réactifs nécessaires avant la manipulation ; s'assurer que la chaîne ne sera pas interrompue jusqu'à la conservation.*
- *Régénérer la souche selon les recommandations dans la notice en utilisant les réactifs, milieux et matériels cités et en respectant les conditions d'incubation (température, temps d'incubation qui est à prolonger en cas de pousse insuffisante ou nulle, atmosphère, etc.)*
- *Valider la souche :*
 - *L'identifier avec une galerie complète ou minimale pour les germes difficiles ou à identification longue ;*
 - *Vérifier le profil de la souche en le testant avec les antibiotiques (...)* *pour lesquels elle est choisie comme contrôle, pour le comparer avec les caractères qu'on attend d'elle ;*
 - *Reporter les résultats sur une fiche d'enregistrement à classer.*

- *Repiquer la souche en gélose inclinée à partir de la primoculture et incuber dans les conditions requises.*
- *Conserver à – 70°C dans trois cryotubes sur des portoirs différents rangés si possible dans deux congélateurs différents ; un portoir servira de stock permanent et au moins un, de stock de travail.*
- *Repiquer sur milieu solide en boîte le plus souvent à chaque sortie à – 70°C, en grattant à la surface du cryotube sans décongeler complètement (ou en décongelant rapidement à 37°C, en agitation douce au bain-marie et en recongelant le plus rapidement possible après ensemencement).*
- *Valider la souche par identification minimale en même temps que les tests de contrôle des produits à effectuer.*
- *Enregistrer les résultats d'identification et des tests de contrôle dans une fiche à classer.*
- *Revenir toujours en cryotube d'origine en cas de validation fautive de la*

souche. Si le problème persiste après avoir vérifié toutes les autres étapes

des tests, changer de cryotube.

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

La validation des résultats passe par l'utilisation des souches de référence (...) [2, 8, 28, 44, 45] dont les valeurs des CMI pour les antibiotiques testés sont connues (Normes NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards) [28]. Il faut auparavant lire les valeurs des CMI des souches de référence et comparer les résultats avec les normes NCCLS. Il en est de même pour l'antibiogramme standard.

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

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

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

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

* Tableau II : Souches de référence et antibiotiques testés

<i>Souches de Référence</i>	Escherichia coli ATCC 25922	Staphylococcus aureus ATCC 29213
<i>Antibiotiques</i>		
<i>Amoxicilline /Acide clavulanique</i>		
<i>Cefotaxine</i>		
<i>Ticarcilline /Acide clavulanique</i>		

* E-test

✓ Matériels utilisés

Nous avons utilisé le matériel suivant :

- *Applicateurs*
- *Cassettes pour la sélection d'antibiotiques*
- *Bandes adhésives*
- *Dessicateurs*
- *Tubes de stockage*
- *Ecouvillons stériles (coton cardé + baguettes en bois)*
- *Pinces*
- *Echelles Mac Farland*

- *Bandes E-test*
- *Boîtes de pétri de 90 ou 150mm de diamètre*
- *Guide de lecture*
- *Nouvelles normes NCCLS*
- *pHmètre*
- *Milieu Mueller Hinton*

✓ Principe

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

✓ Technique

- *Préparer le milieu.*
- *Préparer l'inoculum de la souche de référence et ajuster sa turbidité à l'échelle Mac Farland.*

- *Ensemencer la gélose à l'aide d'un écouvillon.*
 - *Préparer les bandelettes d'antibiotiques.*
 - *Appliquer les bandes en s'assurant avant tout que la surface de la gélose est bien séchée. Une fois la bande déposée (après s'être assuré que la face graduée de la bande est bien celle en contact avec le côté adhésif de l'applicateur), elle ne doit plus être déplacée pour éviter de gêner la diffusion immédiate de l'antibiotique.*
 - *Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.*
 - *Lire les CMI : les boîtes sont lues après la période d'incubation recommandée, à condition d'avoir une croissance significative à la surface de la gélose et que l'ellipse d'inhibition soit clairement visible. La CMI est lue au point d'intersection de l'ellipse et de la bande.*
- La lecture ne présente pas de difficulté lorsque la zone d'inhibition est parfaitement définie et symétrique. Dans les autres cas, une interprétation est nécessaire :*
- *l'observation d'un décrochage du « dip » dans la zone de lecture impose de lire la CMI en extrapolant la courbe de l'ellipse.*
 - *la présence de colonies « squatter » doit être analysée ; il peut s'agir d'une résistance hétérogène, de l'émergence de mutants résistants ou de mélanges bactériens.*
 - *l'existence d'une hémolyse sur gélose au sang peut rendre délicate l'estimation de CMI et ne doit pas interférer avec la lecture.*

- *la présence d'une croissance bactérienne en ligne le long de la bandelette n'a pas de signification bactériologique et est certainement due à une gélose insuffisamment séchée avant le dépôt de la bandelette.*
- *les points d'intersection sur la bandelette peuvent être asymétriques ; la CMI correspond à la concentration la plus haute lue sur la règle.*

Quelle que soit la méthode utilisée, les contrôles de qualité sur les milieux de culture et l'inoculum doivent être obligatoirement effectués. D'autres contrôles spécifiques à chaque méthode sont aussi obligatoires.

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

II-4-1-1 Préparation

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

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

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

II-1-4-2-1 Contrôle de la profondeur

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

II-1-4-2-2 Contrôle du pH

Le pH d'un milieu préparé n'a pas besoin d'être systématiquement vérifié lorsqu'il est correctement préparé à partir de poudre déshydratée. Si le milieu est préparé à partir des constituants de base, il faut le laisser refroidir avant de vérifier son pH. Les milieux solides seront testés à l'aide d'une électrode de surface, ou après macération dans de l'eau distillée.

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

II-1-4-2-3 Contrôle de la stérilité

Le contrôle de la stérilité consiste à « pratiquer les épreuves de stérilité habituelles sur les milieux auxquels on a ajouté du sang ou autres éléments après autoclavage : prélever 3 à 5% de chaque lot et incuber à 35°C pendant 2 jours ».

Dans le cas de la microdilution, les milieux liquides doivent être contrôlés. Chaque lot de milieu préparé est soumis à un contrôle de stérilité (...). Un

millilitre de chaque milieu préparé est déposé dans des tubes à hémolyse stériles qui sont incubés à 37°C pendant 48 heures.

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

II-1-4-2-4 Contrôle de l'efficacité

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

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

II-1- 4-3 Conservation des milieux préparés

1 - les mettre à l'abri de la lumière du soleil.

2 - les mettre à l'abri de la chaleur. Les milieux contenant du sang, d'autres additifs organiques, ou des antibiotiques, doivent être conservés au réfrigérateur.

3 - La durée de conservation des milieux préparés, lorsqu'ils sont stockés dans un endroit frais et sombre, dépendra du type de récipient utilisé.

Les durées de conservation habituelles sont les suivantes :

- Tubes bouchés avec du coton hydrophile : trois semaines.*
- Tubes à bouchons non hermétiques : deux semaines.*

- *Boîtes de pétri, si elles sont dans des sacs en plastique scellés : quatre semaines [6].*

Il faut toujours vérifier la date de péremption des milieux.

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

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

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

II-1-6 Autres contrôles

- Antibiogramme standard

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

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

- E-Test

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

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

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

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

▪ Les cultures

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

Les cultures peuvent aussi être maintenues à l'état lyophilisé. Quelle que soit la méthode, les cultures peuvent être stockées sans risque apparent affectant leur sensibilité.

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

Remarque

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

II-1-7 Documentation

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

des actions correctives doit être vérifiée et lorsque des problèmes sont récurrents, des actions préventives doivent être entreprises. Les preuves qu'on a décidé et mené des actions correctives ou préventives puis testé leur efficacité doivent être conservées [38].

II-1-8 Audit de qualité interne

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

II-2 CONTROLE EXTERNE DE LA QUALITE DE LA SENSIBILITE

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

Il existe plusieurs façons d'effectuer le contrôle externe de la qualité de la sensibilité aux antibiotiques. Dans certains systèmes, les isolats bactériens sont envoyés à un laboratoire de référence central utilisant une méthode de référence standardisée, et les résultats sont recueillis et maintenus par ce laboratoire. Dans d'autres systèmes, la méthode du E-Test est utilisée par les laboratoires participants pour tester localement les isolats et les résultats sont transmis à un laboratoire central. Une troisième approche est de collecter directement les résultats des tests de sensibilité des différents laboratoires à l'aide d'un ordinateur ou à travers des disquettes qui sont envoyées à un laboratoire central utilisant un logiciel standardisé comme le WHONET. Le dernier système consiste à faire participer plusieurs laboratoires à travers le monde. Chaque laboratoire utilise une méthode de routine différente de celles

déjà énoncées [43]. Dès que l'on a reçu tous les rapports des laboratoires participants, on leur envoie des réponses correctes (...). Chaque laboratoire a un numéro de code connu de lui seul. Il peut ainsi apprécier ses résultats par rapport aux autres, mais ceux-ci restent anonymes [8, 46].

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

II-2-1 Souches testées

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

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

II-2-2 Profil de sensibilité aux antibiotiques

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

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

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

D : Diffusion par la méthode des disques

E-test : Epsillometer test

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

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

Diffusion par la méthode des disques

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

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

Nous avons réalisé une suspension de colonies pour préparer l'inoculum qui a été ajusté à l'échelle 0,5 Mac Farland standard. Après ensemencement du milieu et dépôt des disques imprégnés d'antibiotiques, nous avons incubé à 35°C à l'air libre pendant 24 heures (48 heures pour l'oxacilline et la pénicilline G avec la souche CDC105, pour la gentamicine et

la streptomycine avec les souches CDC106 et CDC107). Au bout du temps d'incubation, chaque disque apparaissait entouré d'une zone d'incubation qui a été ensuite mesurée.

E-test

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

Nous avons :

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

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

Trois zones sont définies par rapport à la CMI :

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

- ✓ Si $c < \text{CMI} \leq C$, la souche est dite de sensibilité **intermédiaire (I)** : dans ce cas, le succès thérapeutique est imprévisible.

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

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

II-2-3 Recherche de Béta-lactamase

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

II-2-4 Références utilisées pour les valeurs critiques

Les références suivantes ont servi de support d'interprétation :

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

III/ RESULTATS

III-1 CONTROLE INTERNE DE LA QUALITE DE LA SENSIBILITE

III-1-1 Résultats des contrôles effectués

Les résultats dans les tableaux V (*Escherichie coli* ATCC 25922 et VI (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) ont été obtenus au bout de dix ans de contrôle avec la méthode du E-test.

Pour chaque souche de référence et pour chaque antibiotique nous avons effectué une série de douze (12) contrôles.

La souche de référence *Escherichia coli* ATCC 25922 a montré une bonne reproductibilité. En effet tous les antibiotiques testés ont donné des CMI comprises entre les limites acceptables (tableau V et figures 6, 7 et 8). De plus pour l'association amoxicilline / acide clavulanique, pour le céfotaxime et pour l'association Ticarcilline / acide clavulanique, les CMI les plus reproductibles sont respectivement 6 µg/ml (6 fois sur les 12 contrôles, soit 58%), 0,064 µg/ml (9 fois sur les 12 contrôles soit 83%) et 3µg/ml (6 fois sur les 12 contrôles, soit 50%).

Avec *staphylococcus aureus* ATCC 29213, les résultats sont totalement bons en testant l'association amoxicilline / acide clavulanique et l'association ticarciline / acide clavulanique dont les limites acceptables sont respectivement 0,12 – 0,5 µg/ml et 0,5 – 2 µg/ml (tableau VI et figure 9 et 11).

Le céfotaxime a donné des CMI situées hors de ses limites acceptables (la limite inférieure ou minimale est égale à 1 µg/ml et la limite supérieure ou maximale est égale à 4µg/ml (tableau VI et figure 10). Ainsi une CMI de 8

$\mu\text{g/ml}$, supérieure à la limite maximale, a été obtenue deux fois. La valeur de $0,06 \mu\text{g/ml}$, située en dessous de la limite minimale a été obtenue une fois.

Tableau V : CMI de différents antibiotiques testés sur *Escherichia coli* ATCC 35 922 sur une période d'une année

Antibiotiques	1er mois	2ème mois	3ème mois	4ème mois	5ème mois	6ème mois	7ème mois	8ème mois	9ème mois	10ème mois	11ème mois	12ème mois
Amoxiciline/Acide clavulanique	4,000	4,000	6,000	6,000	6,000	8,000	4,000	6,000	6,000	4,000	6,000	6,000
Céfotaxime	0,006	0,094	0,064	0,064	0,064	0,064	0,060	0,064	0,064	0,060	0,064	0,064
Ticarcilline /Acide clavulanique	3,000	3,000	6,000	2,000	6,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	2,000	4,000

Tableau VI: CMI de différents antibiotiques testés sur *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 sur une période d'une année

Antibiotiques	1er mois	2ème mois	3ème mois	4ème mois	5ème mois	6ème mois	7ème mois	8ème mois	9ème mois	10ème mois	11ème mois	12ème mois
Amoxiciline/Acide clavulanique	0,380	0,500	0,500	0,380	0,190	0,250	0,380	0,380	0,500	0,350	0,500	0,500
Céfotaxime	8,000	2,000	3,000	0,060	1,000	4,000	8,000	2,000	2,000	3,000	2,000	1,000
Ticarcilline /Acide clavulanique	0,750	1,000	0,750	0,190	0,250	0,250	0,250	0,750	0,750	0,750	1,000	0,750

III-2 CONTROLE EXTERNE DE LA QUALITE DE LA SENSIBILITE

III-2-1 Souches testées

Nous avons identifié les mêmes souches que celles des autres laboratoires :

- souche CDC103 = *Staphylococcus aureus*
- souche CDC104 = *Staphylococcus aureus*
- souche CDC105 = *Staphylococcus epidermis*
- souche CDC106 = *Enterococcus faecalis*
- souche CDC107 = *Enterococcus faecalis*

Selon Centers for Disease Control and Prevention, les souches CDC103, CDC104 et CDC107 sont respectivement *Staphylococcus aureus ATCC 33591*, *Staphylococcus aureus ATCC 43387*, *Enterococcus faecalis ATCC 51299*.

III-2-2 Profil de sensibilité aux antibiotiques

Nous avons envoyé nos résultats au Centers for Disease Control and Prevention (CDC) qui a été le laboratoire de référence. Les résultats qualitatifs (catégories : sensible, intermédiaire ou résistante) sont donnés dans les tableaux VII, VIII, IX, X et XI à côté des résultats de référence (ceux de CDC) et ceux des autres laboratoires participants. Le code de notre hôpital est SENOO1.

Staphylococcus aureus ATCC 33591 (Tableau VII)

Notre étude a montré que *Staphylococcus aureus ATCC 33591* a été résistante au chloramphénicol, à la clindamycine, à l'érythromycine, à l'oxacilline, à la pénicilline G et à la

tétracycline mais sensible à la ciprofloxacine, à la gentamicine, à la rifampicine et à la vancomycine.

Ces résultats sont identiques à ceux de CDC et de la majeure partie des laboratoires participants.

La souche n'a donné aucune sensibilité intermédiaire face aux antibiotiques testés.

***Staphylococcus aureus* ATCC 43387 (Tableau VIII)**

Nos résultats ont montré que cette souche n'a été résistante qu'à l'oxacilline et à la pénicilline G.

Pour l'oxacilline, CDC a donné un résultat contraire.

En effet la sensibilité de cette souche à l'oxacilline a été établie par les deux méthodes utilisées : la méthode du disque et la méthode de la CMI. Ce même résultat a été donné par 56 des 57 laboratoires participants.

La résistance à la pénicilline G et la sensibilité aux autres molécules restent identiques à nos résultats.

***Staphylococcus epidermidis* CDC 105 (tableau IX)**

Nous avons noté une résistance à la gentamicine, à l'oxacilline, à la pénicilline G et à la vancomycine ; tandis que la souche est sensible au chloramphénicol, à la ciprofloxacine, à la clindamycine, à l'érythromycine, à la rifampicine et à la tétracycline.

Les résultats de CDC et de 48 des 53 laboratoires ont donné une absence d'activité de la ciprofloxacine sur *Staphylococcus epidermidis*, alors qu'elle est sensible d'après notre résultat .

La sensibilité de la souche à la vancomycine reste très variée. En effet là où notre laboratoire l'a qualifiée de souche résistante, les résultats de CDC la donnent comme souche intermédiaire par la méthode de la CMI (8µg/ml) et sensible par la méthode du disque (16 mm) et 63 des 80 laboratoires l'ont qualifiée de souche sensible, 16 de souche intermédiaire et 1 de souche résistante.

Hormis la ciprofloxacine et la vancomycine, tous les autres résultats sont identiques aux nôtres.

***Enterococcus faecalis* CDC 106 (Tableau X)**

La majorité des laboratoires a donné les mêmes résultats que notre laboratoire, résultats confirmés par CDC :

- La gentamicine, la pénicilline G et la streptomycine ont été actives sur *Enterococcus faecalis* CDC 106. Cependant cette sensibilité de la souche est à haut niveau à la gentamicine (500µg/ml et 19 mm) et à la streptomycine (1000µg/ml et 16 mm).
- *Enterococcus faecalis* CDC 106 est résistante à la tétracycline et à la vancomycine.

***Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (Tableau XI)**

Nous avons noté une sensibilité à toutes les molécules avec un haut niveau à la gentamicine et à la streptomycine.

Par rapport aux résultats de CDC, nous notons trois discordances : la souche est à haut niveau de résistance à la gentamicine et à la streptomycine et de sensibilité intermédiaire à la vancomycine.

Le haut niveau de résistance à la streptomycine a été trouvé par 39 des 40 laboratoires qui ont testé cette molécule et 44 des 59 laboratoires ayant testé la gentamicine ont établi un haut niveau de sensibilité.

La sensibilité de la souche est très variée lors du test de la vancomycine par les autres laboratoires. En effet 39 sur 92 laboratoires l'ont qualifiée de souche sensible, 27 de souche intermédiaire et 16 de souche résistante.

Tableau VII: Profil de sensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 33591

Antibiotiques	Valeurs de référence [catégorie]		SENOO1	Autres laboratoires (en nombre)		
	CMI (µg/ml)	Disque (mm)		S	I	R
Chloramphénicol	> 32 [R]	8 [R]	R	2	0	48
Ciprofloxacine	≤ 0,5 [S]	25 [S]	S	55	0	0
Clindamycine	> 8 [R]	6 [R]	R	1	0	53
Erythromycine	> 8 [R]	6 [R]	R	0	0	71
Gentamicine	≤ 4 [S]	17 [S]	S	69	0	0
Oxacilline	> 16 [R]	6 [R]	R	1	0	70
Penicilline G	> 2 [R]	6 [R]	R	1	0	62
Rifampicine	≤ 0,12 [S]	33 [S]	S	62	0	0
Tétracycline	> 16 [R]	6 [R]	R	1	0	49
Vancomycine	≤ 1 [S]	16 [S]	S	90	0	0

Tableau VIII : Profil de sensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 43387

Antibiotiques	Valeurs de référence [catégorie]		SENOO1	Autres laboratoires (en nombre)		
	CMI (µg/ml)	Disque (mm)		S	I	R
Chloramphénicol	8 [S]	18 [S]	S	47	2	0

Ciprofloxacine	0,25 [S]	29 [S]	S	53	0	0
Clindamycine	0,25 [S]	22 [R]	S	52	0	0
Erythromycine	0,5 [S]	23 [S]	S	67	0	0
Gentamicine	≤ 1 [S]	18 [S]	S	69	0	0
Oxacilline	2 [S]	15 [S]	<u>R</u>	56	1	0
Penicilline G	> 2 [R]	6 [R]	R	0	2	59
Rifampicine	$\leq 0,12$ [S]	29 [S]	S	63	0	0
Tetracycline	$\leq 0,25$ [S]	24 [S]	S	49	0	0
Vancomycine	≤ 1 [S]	15 [S]	S	75	0	0

Tableau IX: Profil de sensibilité de la souche *Staphylococcus epidermidis* CDC105

Antibiotiques	Valeurs de référence [catégorie]		SENOO1	Autres laboratoires (en nombre)		
	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Disque (mm)		S	I	R
Chloramphénicol	8 [S]	18 [R]	S	49	1	1

Ciprofloxacine	> 8 [R]	29 [S]	S	2	3	48
Clindamycine	0,25 [S]	22 [R]	S	49	0	1
Erythromycine	0,5 [S]	23 [S]	S	66	2	1
Gentamicine	16 [R]	18 [S]	R	6	5	58
Oxacilline	> 16 [R]	15 [S]	<u>R</u>	10	6	52
Penicilline G	> 2 [R]	6 [R]	R	1	2	60
Rifampicine	≤ 0,12 [S]	29 [S]	S	64	0	0
Tetracycline	< 0,5 [S]	24 [S]	S	48	0	0
Vancomycine	8 [I]	16 [S]	R	63	16	1

Tableau X : Profil de sensibilité de la souche *Enterococcus faecalis* CDC106

Antibiotiques	Valeurs de référence [catégorie]		SENOO1	Autres laboratoires (en nombre)		
	CMI (µg/ml)	Disque (mm)		S	I	R

Haut niveau Gentamicine	500 [S]	19 [S]	S	48	1	4
Penicilline G	2 [S]	18 [S]	S	37	12	4
Haut niveau Streptomycine	1000 [S]	16 [S]	S	36	1	3
Tetracycline		6 [R]	R	1	1	47
Vancomycine	512 [R]	6 [R]	R	1	0	81

Tableau XI : Profil de sensibilité de la souche *Enterococcus faecalis* ATCC 51299

Antibiotiques	Valeurs de référence [catégorie]		SENOO1	Autres laboratoires (en nombre)		
	CMI (µg/ml)	Disque (mm)		S	I	R
Haut niveau Gentamicine	500 [R]	6 [R]	S	15	0	44
Penicilline G	4 [S]	17 [S]	S	39	13	3
Haut niveau Streptomycine	1000 [R]	6 [R]	S	1	0	39
Tetracycline	< 1 [S]	25 [S]	S	32	1	0
Vancomycine	16 [I]	16 [I]	S	39	27	16

III-2-3 Recherche de bêta-lactamase

Staphylococcus aureus ATCC 335591, *Staphylococcus aureus* ATCC 43387 et *Staphylococcus epidermidis* CDC 105 sont productrices de bêta-lactamase.

IV – DISCUSSION

*IV-1 CONTROLE INTERNE DE LA QUALITE DE LA
SENSIBILITE*

Le E-test nous a servi de technique pour effectuer nos contrôles. Une série de douze contrôles a été réalisée pour chaque souche de référence utilisée, à savoir *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Les antibiotiques (l'association amoxicilline / acide clavulanique, le céfotaxime et l'association ticarcilline / acide clavulanique) sont les mêmes pour les deux souches de référence.

IV-1-1 E-test

Le E-test est une variante de l'antibiogramme standard [10] encore appelé diffusion par la méthode des disques. Par rapport à cette dernière, le E-test permet une lecture directe de la CMI [10].

Partant de nos résultats, nous pouvons dire que le E-test est une technique reproductible. D'ailleurs plusieurs études comparatives rapportent la sensibilité et la reproductibilité de cette méthode ; notamment par rapport aux autres méthodes d'étude de la sensibilité [25, 40].

C'est ainsi qu'en 1997, **FAYE I.** [15] l'a utilisé dans la surveillance de la sensibilité aux antibiotiques de souches bactérienne isolées à Dakar. Il en est de même pour **MARRA M. A** [28] qui l'a utilisée dans la détermination de la sensibilité des souches dakaroises de *Staphylococcus aureus*.

Pour obtenir une bonne reproductibilité de la technique du E-test, nous avons bien pris soin de contrôler toutes les phases du processus de contrôle, de la préparation des milieux aux cultures de travail en passant par la préparation de l'inoculum, l'ensemencement des milieux et le dépôt des bandes.

Pour les milieux, nous avons surtout veillé à avoir une profondeur de 4 mm \pm 0,5 et un pH de 7,4 \pm 0,2 selon les recommandations du National Committee for Clinical Laboratory Standards. Ces normes sont respectées dans les travaux de **FAYE I.** [15] et de **MARRA M. A.** [28], et de ceux de **MACIAS E., MASONE O. JR** et al [25].

Ces mêmes auteurs ont procédé de la même manière que nous en stérilisant les milieux de culture par autoclavage et en les rendant efficaces par utilisation de souches de référence.

Nous avons contrôlé, de même que **FAYE I.** [15] et **MARRA MA** [28]; la qualité de l'inoculum par comparaison avec un étalon d'opacité c'est-à-dire l'échelle de Mc FARLAND [18].

Nous avonsensemencé les milieux par écouvillonnage (**technique de Kirby Baeur**) selon les recommandations du National Committee for Clinical Laboratory Standarts.

Les deux souches de référence que nous avons utilisées à titre d'exemple (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) sont celles recommandées par l'American Type Culture Collection (ATCC).

IV-1-2 Les souches de référence

***Eschérichia coli* ATCC 25922**

Tous les contrôles de qualité effectués à l'aide de cette souche nous ont révélé une très bonne reproductibilité. En Effet, les antibiotiques testés ont donné des CMI comprises entre leurs limites acceptables : figure 6 (Amoxicilline / acide clavulamique), figure 7 (céfotaxime) et figure 8 (Ticarcilline / acide clavulamique).

Selon **BROWN D. F. et KING A. [8]** ; la souche de référence est une souche qui possède tous les caractères d'un groupe de bactéries et qui est génétiquement stable. Dès lors nous pouvons dire que *Escherichia coli* ATCC 25922 peut être utilisée pour valider les résultats des tests de sensibilité des entérobactéries parmi lesquelles les souches d'*Eschérichia coli*. Ainsi **FAYE I. [15]** l'a utilisée en 1997 pour valider ses résultats dans la surveillance de la sensibilité aux antibiotiques de souches bactériennes isolées à Dakar. Parmi ces souches, il a testé la sensibilité des souches d'*Eschérichia coli* contre l'association amoxicilline / acide clavulanique. La reproductibilité obtenue avec *Eschérichia coli* ATCC 25922 lui a permis de valider ses résultats.

***Escherichia coli* ATCC 25922 a servi de souche de contrôle à MARRA M.A [28]** pour valider ses résultats dans la détermination par E-test de la sensibilité des souches dakaroises de *Staphylococcus aureus* qui est un Cocci Gram positif. De là, nous pouvons dire que la reproductibilité d' *Escherichia coli* ATCC 25922 va même au-delà des seules entérobactéries. Ceci est d'ailleurs confirmé par les travaux de **TENOVER F.C, MOHAMAED J. et al [43]** qui l'ont utilisée dans un système d'évaluation de la qualité de la sensibilité (mis en place par l'organisation mondiale de la santé) de *Streptococcus pneumoniae* et de *Staphylococcus epidermidis*, autant de Cocci à gram positif que *Staphylococcus aureus*.

Parmi les antibiotiques testés par **MARRA M. A.** [28] nous avons l'association amoxicilline / acide clavulanique et parmi ceux testés par **TENOVER F. C., MOHAMMED J. et al** [43], nous avons le céfotaxime, deux des antibiotiques que nous avons testés et contre lesquels la reproductibilité a été totale.

En définitif, nous pouvons dire que *Escherichia coli* ATCC 25922 est une souche de référence fiable en vue d'établir un antibiogramme de qualité.

***Staphylococcus aureus* ATCC 29213**

Notre étude nous a révélé qu'avec cette souche, le céfotaxime a donné trois CMI situées hors de ses limites acceptables (**figure 10**). Des douze contrôles effectués, neuf étaient donc compris entre les limites inférieure et supérieure, soit une reproductibilité de 75% la CMI supérieure à la valeur maximale s'expliquerait par une augmentation involontaire de la densité de l'inoculum et celle inférieure à la valeur minimale par une diminution involontaire.

Avec les autres molécules (les associations amoxicilline / acide clavulanique et Ticarcilline / acide clavulanique, la reproductibilité a été totale (**figures 9 et 11**).

Dans l'ensemble, nous pouvons dire que *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 est une souche fiable. C'est pourquoi elle a été utilisée par **MARRA M.A.** [28] pour valider les études de sensibilité des souches dakaroises de *Staphylococcus aureus*. **FAYE I** [15]. l'a aussi utilisée en vue d'obtenir des résultats de qualité dans la surveillance de la sensibilité aux antibiotiques de souches bactériennes isolées à Dakar.

Comme l'ont affirmé **BROWN D. F.** et **KING A.** [8], *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 est une souche qui présente tous les caractères des Cocci à Gram positif. Par conséquent elle peut être utilisée comme souche de contrôle des Cocci à Gram positif, à savoir les staphylocoques et les entérocoques.

IV-2 CONTRÔLE EXTERNE DE LA QUALITE DE LA SENSIBILITE

IV-2-1 Méthodes utilisées

La diffusion par la méthode des disques ou antibiogramme standard a été la technique la plus utilisée au cours de ce travail. Etant plus facile à mettre en œuvre, cette technique est en pratique plus souvent utilisée que la technique de référence [10], en l'occurrence la dilution en milieu gélosé dont la réalisation est lourde et réservée aux laboratoires spécialisés [4].

Le E-test a été utilisé en parallèle avec la méthode des disques lors du test de sensibilité à l'*oxacilline* avec *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus aureus* ATCC 43387 et *Staphylococcus epidermidis* et à la pénicilline G avec la souche *Enterococcus faecalis* et la souche de référence *Enterococcus faecalis* ATCC 51299.

L'emploi parallèle de ces deux méthodes nous a permis de mettre en évidence nos résultats.

Le E-test est une variante de l'antibiogramme par diffusion [10]. Son choix s'explique par le fait que c'est une technique sensible et reproductible plusieurs études comparatives rapportent la sensibilité et la reproductibilité de

cette méthode ; notamment par rapport aux autres méthodes d'étude de la sensibilité [25, 40].

Le choix de l'antibiogramme standard s'explique donc par sa mise en œuvre facile et celui du E-test par sa sensibilité et sa reproductibilité.

IV-2-2 Profil de sensibilité aux antibiotiques

* *Staphylococcus aureus* ATCC 33591

Nos résultats (tableau VII) sont identiques à ceux de centers for disease control and prevention (CDC). La majeure partie des laboratoires participants a donné les mêmes résultats.

La concordance des résultats montre que notre laboratoire a bien respecté les recommandations du National Committee for Clinical Laboratory Standards et celles du Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie qui ont servi de références. Autrement dit, tous les contrôles de qualité se rapportant, entre autres, à la préparation des milieux de culture, à la densité de l'inoculum, aux disques d'antibiotiques ou aux bandelettes. (selon la méthode) ont été faits.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 43387

Nous avons qualifié cette souche comme étant résistante à l'oxacilline (Tableau VIII). Par contre, pour CDC et 56 des 57 laboratoires participants (Tableau VIII), cette souche est sensible à l'oxacilline bien qu'elle soit bêta-lactamase positive.

Notre résultat peut être expliqué par le fait que *Staphylococcus aureus* ATCC 43387 peut donner de façon occasionnelle une CMI résistante de 4 µg/ml (la valeur de référence minimale est de 2µg/ml et la valeur maximale est de 4 µg/ml). En outre si la charge du disque est très faible ou si le temps d'incubation est inférieur à la normale, la souche apparaîtrait résistante parce que sa croissance ne serait pas inhibée normalement.

C'est ainsi que nous avons décidé de vérifier le résultat en associant le E-test à l'antibiogramme standard avec un temps d'incubation de 24 heures. Le résultat obtenu par les deux méthodes a confirmé la sensibilité de la souche à l'oxacilline

Selon CDC, cette souche est mec A. négative (gène responsable de la résistance comme chez *Staphylococcus aureus* ATCC 33591). Et d'après **MARRA M.A. [28]**, c'est le gène mec A. qui code pour la synthèse d'une PLP additionnelle dite PLP2' ou PBP 2A dont l'affinité pour les antibiotiques est très faible. Ce qui confirme la sensibilité de *Staphylococcus aureus* ATCC 43387.

* *Staphylococcus epidermidis* CDC 105

les résultats de CDC et de 48 des 53 laboratoires ont donné une absence d'activité de la ciprofloxacine sur cette souche, (Tableau IX), alors qu'elle est sensible d'après notre résultat (Tableau IX).

Dans un autre système d'évaluation de la qualité de la sensibilité aux antibiotiques, 83 des 87 laboratoires participants confirment l'absence d'activité

de la ciprofloxacine sur *Staphylococcus epidermidis* CDC 105, autrement dit, la résistance de cette souche à la ciprofloxacine [43]. Dans ce système les résultats de référence sont fournis par l'organisation mondiale de la santé (OMS).

Dès lors, nous avons refait la détermination de la sensibilité de la souche par la même méthode (l'antibiogramme standard) en ayant pris soin de bien ajuster la charge du disque d'antibiotique, la densité de l'inoculum et de mesurer convenablement le diamètre d'inhibition ; les trois facteurs supposés être à l'origine de la discordance.

Ainsi la correction nous a donné le même résultat que celui fourni par le système d'évaluation à lequel nous avons participé et par celui géré par l'OMS [43] : *Staphylococcus epidermidis* CDC 105 est résistante à la ciprofloxacine.

Un deuxième résultat discordant a été obtenu lors du test de la vancomycine sur *Staphylococcus epidermidis* CDC 105. En effet, notre travail a montré que cette souche est résistante à la vancomycine au moment où 63 des 80 laboratoires l'ont qualifiée de souche sensible, 16 de souche intermédiaire et 1 de souche résistante. D'après les résultats de CDC obtenus par la méthode de la CMI, la souche est de sensibilité intermédiaire, mais se trouve être sensible à la vancomycine par la méthode du disque.

Selon CDC, la méthode du disque n'est pas très fiable pour déterminer la sensibilité de *Staphylococcus epidermidis* CDC 105 car c'est une souche qui pose de sérieux problèmes lorsque cette technique est utilisée. La méthode de référence est la microdilution sur bouillon probablement utilisé par OMS avec une CMI de 8µg/ml [43], identique à celle de CDC et contre laquelle la souche se trouve être de sensibilité intermédiaire. Ceci est confirmé par 26 des 31

laboratoires participant dans le système d'évaluation mis en place par l'OMS [43].

Nous avons utilisé le E-test, connu pour sa sensibilité et sa reproductibilité par rapport aux autres méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques [25, 40], pour vérifier notre résultat. Ainsi le résultat quantitatif a donné une CMI comprise entre les valeurs critiques. *Staphylococcus epidermidis* CDC 105 est donc de sensibilité intermédiaire à la vancomycyne.

**Enterococcus faecalis* CDC 106

Aucun résultat discordant n'a été observé entre notre laboratoire et CDC (Tableau X). Cependant 4 des 53 laboratoires participants ont trouvé un haut niveau de résistance à la gentamicine et 3 des 40 laboratoires, un haut niveau de résistance à la streptomycine, résultats contraires aux nôtres.

Des études menées à New York [47] et à Dakar par **LO P. A.** à l'hôpital Aristide Le Dantec [25] ont montré que les entérocoques possèdent plusieurs mécanismes de résistance parmi lesquels la détoxification enzymatique de l'antibiotique surtout les aminosides (gentamicine et streptomycine). D'après **LO P. A.** [25], ce mécanisme est responsable de l'apparition de souches entérocoques hautement résistantes aux aminosides. C'est ainsi que l'hôpital Henri Mondor a obtenu, en 1992, 22% de souches d'*Enterococcus faecalis* CDC 106 à haut niveau de résistance à la gentamicine [25].

Donc même si la majeure partie des laboratoires ont trouvé un haut niveau de sensibilité à la gentamicine et à la streptomycine, cela n'infirme pas pour autant le haut niveau de résistance issu des résultats de quelques laboratoires.

**Enterococcus faecalis ATCC 51299*

Nous avons qualifié cette souche à un haut niveau de sensibilité à la gentamicine et à la streptomycine, alors qu'elle connaît un haut niveau de résistance aux deux antibiotiques d'après les résultats de CDC. Le haut niveau de résistance est aussi donnée par la majeure partie des laboratoires (Tableau XI).

Si, à partir de la méthode du disque que nous avons utilisée, la densité de l'inoculum est faible et la charge antibiotique du disque très forte, cela peut expliquer le haut niveau de sensibilité.

Selon CDC, cette souche est recommandée par le National Committee for Clinical Laboratory Standards pour le contrôle de qualité du haut niveau de résistance à la gentamicine et à la streptomycine. Donc la souche connaît bien un haut niveau de résistance à ces antibiotiques.

Ces résultats peuvent être confirmés par les travaux menés à New York [47] et par celui de **LO P. A.** [25] qui ont donné le mécanisme de résistance à haut niveau par détoxification enzymatique des aminosides par les entérocoques.

Par rapport à la vancomycine, les résultats varient très largement. C'est ainsi que pour CDC, la souche connaît une sensibilité intermédiaire obtenue à la fois par la méthode du disque et de la CMI. La souche est sensible selon notre laboratoire. 39 sur 92 laboratoires l'ont qualifiée de souche sensible, 27 de souche intermédiaire et 16 de souche résistante. Cette disparité s'explique par le fait que la souche fournit un isolat difficile à tester. Cependant, *Enterococcus faecalis ATCC 51299* reste une bonne souche de référence pour le contrôle de qualité des tests de sensibilités des entérocoques [47].

Pour un clinicien, le succès d'un schéma thérapeutique repose sur l'obtention d'un antibiogramme de qualité fourni par un bactériologiste. Et pour ce dernier, un antibiogramme de qualité est l'aboutissement d'un processus de contrôle effectué lors de la détermination in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. A ce titre le bactériologiste se doit d'instaurer un programme de contrôle de qualité au sein de son laboratoire pour faire face à tous les facteurs qui peuvent affecter les résultats des tests de sensibilité.

C'est dans cette optique que nous nous sommes proposés de donner toutes les procédures de contrôle in vitro de la sensibilité aux antibiotiques avec comme point focal l'utilisation des souches de référence en contrôle interne.

A titre d'exemple nous avons utilisé deux souches de référence, à savoir *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 dont les reproductibilités ont été évaluées pendant une année contre l'association amoxicilline/acide clavulanique, le céfotaxime et l'association ticarcilline/acide clavulanique. Ainsi pour chaque souche et pour chaque antibiotique, nous avons effectué douze contrôles par la méthode du E-test.

Escherichia coli ATCC 25922 a donné une reproductibilité totale avec tous les antibiotiques testés. Pour *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, nous avons obtenu une reproductibilité de 75% entre les limites acceptables avec le céfotaxime. Les CMI situées hors des limites acceptables s'expliqueraient par une augmentation involontaire de la densité de l'inoculum pour la CMI supérieure à la valeur maximale et par une diminution involontaire de l'inoculum pour la CMI inférieure à la valeur minimale. Par contre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a donné une reproductibilité totale avec les associations amoxicilline /acide clavulanique et tircarcilline/acide clavulanique.

Une souche de référence étant une bactérie qui présente tous les caractères d'un ensemble de bactéries, nous avons considéré que les résultats des tests de sensibilité sur les entérobactéries pourraient être validés par l'utilisation

d'*Escherichia coli* ATCC 25922 et ceux sur les Cocci à Gram positif le seraient par *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Cependant, la seule utilisation des souches de référence ne suffit pas pour asseoir un antibiogramme de qualité. En effet, il nous a fallu d'abord une très bonne organisation du laboratoire et un entretien courant du matériel, ensuite toutes les étapes du processus de validation ont été contrôlées, Ainsi nous avons eu :

- des milieux de culture stériles et efficaces avec une profondeur et un pH conformes aux normes internationales,
- un inoculum d'ensemencement ajusté à l'échelle de Mc FARLAND,
- un ensemencement par écouvillonnage,,
- une application correcte des bandelettes d'antibiotiques,
- une période d'incubation normale donnant une meilleure lecture.

C'est à ce prix que les tests à effectuer seront validés à partir des deux souches de référence que nous avons utilisées, d'où un antibiogramme de qualité.

En remarque, ces procédures de contrôle sont valables quelle que soit la souche de référence utilisée.

Ces séries de mesures constituent aussi une évaluation interne de la qualité car elles nous ont permis de voir si les résultats étaient bons c'est à dire reproductibles.

L'antibiogramme ne saurait être fiable que si le contrôle de qualité interne et l'évaluation interne de la qualité sont complétés par la participation à un système d'évaluation externe de la qualité. C'est ainsi que nous avons participé, à côté de plusieurs laboratoires étrangers, à un système d'évaluation externe en collaboration avec Centers for Disease Control and Prevention ;

jouant le rôle de laboratoire de référence. Ainsi les résultats de cinq antibiogrammes ont été confrontés.

Les souches testées ont été :

- *Staphylococcus aureus ATCC 33591*
- *Staphylococcus aureus ATCC 43387*
- *Staphylococcus epidermidis CDC 105*
- *Enterococcus faecalis CDC 106*
- *Enterococcus faecalis ATCC 51299*

Au terme de cette confrontation, nous avons décelé cinq résultats discordants :

- ✓ un avec *Staphylococcus aureus ATCC 43387* : la souche n'est pas résistante mais sensible à l'oxacilline,
- ✓ deux avec *Staphylococcus epidermidis CDC 105* : cette souche est résistante et non sensible à la Ciprofloxacine et elle est plutôt de sensibilité intermédiaire que résistante à la Vancomycine,
- ✓ deux avec *Enterococcus faecalis ATCC 51299* : la souche est à haut niveau de résistance à la Gentamicine et à la Streptomycine alors que nous l'avons qualifié de souche à haut niveau de sensibilité.

Ces résultats discordants ont été revus et corrigés avec toutes les précautions possibles.

A travers la volonté de fournir un antibiogramme de qualité, le contrôle externe est aussi une procédure d'évaluation des compétences des laboratoires participants.

En somme, la mise en place d'un antibiogramme de qualité est donc un processus d'assurance qualité dont les principales étapes sont le contrôle interne, l'évaluation interne et le contrôle externe de la qualité.

Dans la recherche de la qualité, le bactériologiste voudra faire toujours plus. Dans cet optique nous recommandons :

- Une formation assidue et pratique d'un personnel responsable pour constituer ce qu'on appelle le cercle de la qualité supervisé par un bactériologiste,
- L'instauration de systèmes de contrôle externe interlaboratoires à l'échelle nationale car il faut prendre en compte la qualité métrologique des résultats,
- La dotation de tous les laboratoires nationaux de moyens adéquats car certaines techniques d'étude de la sensibilité des bactéries aux antimicrobiens ne sont pas à la portée de tous les laboratoires.

1- AFNOR

Gérer et assurer la qualité

AFNOR, *Paris, 1995*

2 - Aihara M.**Quality control on antimicrobial susceptibility tsestings**

[article in japonese]

Rinsho byori. 2002 Jul; 50 (7) : 706 – 11

3 – Ba O.

Etude de l'activité bactériologique au laboratoire du centre hospitalier régional de Thiès durant l'année 2000.

Thèse pharm, *Dakar, 2002, n° 06*

4 – Bergogne – Berezin E., Brogard J. M.

Bases biologiques de l'antibiothérapie

Masson, *Paris, 1999, 22 – 52*

5 – Bergogne - Berezin E., Dellamonica P.

Antibiothérapie en pratique chimique

Masson 2^e édition, 1999, 17 – 21

6 – Bocoum M. O. M.

l'assurance qualité en microbiologie : application dans le diagnostic biologique des infections respiratoires basses aiguës à Dakar

Thèse pharm, *Dakar, 2001, n°119*

7 – Bronzlvaer S., Bucholz U., Courvalin P.

Comparability of antimicrobial susceptibility test results from 22 european countries and Israel : an external quality assurance exercise of the european antimicrobial resistance surveillance system (EARSS) in collaboration with the United Kingdom National External Quality Assurance Scheme (UKNEQAS)

J. Antimicrob. Chemother 2002 Dec; 50 (6) Suppl 1 : 953 – 64

8 – Brown D. F., King A.

Quality assurance of antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion

J. Antimicrob. Chemother 2001 Jul; 48 Suppl 1 : 71 – 6

9 – Cruchant L.

La qualité

Vendôme, Presses universitaires de France, 1998, p127

10- Delignette-Muller M. L.

Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de microorganismes

Thèse pharm.. Lyon, 1995 n° d'ordre 118 – 95

11 – Diop M.

Contribution à la mise en place d'un système d'assurance qualité dans un laboratoire : exemple du laboratoire de contrôle des médicaments du Sénégal.

Thèse pharm, Dakar, 2001, n°65

12 - Diouf F.

Macrolides, lincosamides, streptogramines, azolides et kétolides en thérapeutique infectieuse : Données bactériologiques

Thèse pharm, Dakar, 2001, n°43

13 – Drame B.

Microméthodes d'identification et d'étude de la sensibilité des entérobactéries : Intérêts thérapeutiques et diagnostics

Thèse pharm, Dakar, 2001, n°86

14– Duval J., Soussy C. J.

Antibiothérapie

Bases bactériologiques pour l'utilisation des antibiotiques

4^e édition, Paris, Masson, 1990 , 37 – 48

15- Faye I.

Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques de souches bactériennes isolées à Dakar.

Intérêt de l'utilisation de la technique du E-test et programme

Whonet III

Thèse pharm, Dakar, 1997, n°7

16 – Feinberg M.

La validation des méthodes d'analyse

Une approche chimométrique de l'assurance qualité au laboratoire

Paris, Masson, 1996, 7 – 12

17 – Guerin – Fauble V., Carre G.

L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêts et limites

Journées nationales GIV – INRA, 1999, 5 – 12

18– Jorgensen J. H., Ferraro M. J.

Antimicrobial susceptibility testing : general principal and contemporay practices

Clin. Infect. Dis ..., 1998 , 26 : 973 – 980

19- Jorgensen J. H.,Turnidge J. D., Washington J. A.

Antimicrobial susceptibility tests : dilution and disk diffusion methods

In : Murray P. R., Baron E. J., Pfllek M. A., Tenover F. .C., Volken R. .H.

Eds : Manual of clinical microbiology

Washington D. C. ASM Press. 1999, 1526 – 1542

20 - Juran J. M.**Gestion de la qualité**

AFNOR, Paris, 1983.

21 – Konaté B.

Microméthode d'identification et d'étude de la sensibilité des staphylocoques, entérocoques, et streptocoques. Intérêts et application dans le diagnostic rapide des infections .

Thèse pharm, Dakar, 2001, n° 100

22- Konaté D.

Standardisation, optimisation et évaluation d'une microméthode d'étude de la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux.

Thèse pharm, *Dakar, 2001, n° 84*

23- Le Moel G., Piton A., Pontezier C.

Assurance qualité : contrôle de qualité interne et évaluation externe de la qualité.

Ann. Biol. Clin. Janvier – Février 2000 ; 58 (1) : 103 – 10

24 – Lô P. A.

Vancomycine résistance et haut niveau de résistance aux aminosides de souches enterocoques isolées à Dakar

Thèse Pharm, Dakar, 1998, n°43

25 – Macias E. Masone O. J. R. et al.

Comparison of E-test with standard broth microdilution for determining antibiotic susceptibility of penicillin – resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* .

J. Clin. Microbiol. 1994, 32 (2) : 430 – 432.

26- Mare L.

Contribution à l'assurance de la qualité dans un laboratoire d'essais : cas du laboratoire de chimie analytique et de toxicologie de la faculté de Médecine et Pharmacie

Thèse pharm, *Dakar, 2001 n°61*

27 - Marmonier A. A.

Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques

Dans : Carbonelle et coll.

Eds : Bactériologie médicale : techniques usuelles

Paris, SIMEF, 1987, 227 – 237

28– Marra M. A.

Détermination par E-test de la sensibilité des souches dakaroises de *Staphylococcus aureus*

Thèse pharm, *Dakar, 1998, n° 46*

29 – Norme ISO 8402

Définition de la qualité

Juillet 1995

30– 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.

Août 1994.

31– 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 .

32– Norme ISO 9002

Système qualité – modèle pour l'assurance de la qualité en production et installation

Août 1994.

33 - Norme ISO 9003

Système qualité modèle pour l'assurance de la qualité en contrôle et essais finaux.

Août 1994 .

34 – Norme ISO 9004

Gestion de la qualité et éléments de système de qualité – lignes directrice.

AFNOR, Juillet 2000

35 – Norme ISO 9000

Système de management de la qualité – principes essentiels et vocabulaire

AFNOR, Juillet 2000

36 – Norme ISO 9001

Système de management de la qualité – exigences (Référentiels pour certification)

AFNOR, Juillet 2000

37 – Norme ISO 9004

Système de management de la qualité – conseil pour l'amélioration de la qualité

AFNOR, Juillet 2000

38 – Provost Y.

L'assurance qualité appliquée au service de biologie

Rev. française des laboratoires. Avril – Mai 1995 n° 275

39 – Robert – Dernuet S.

Antibiotiques et antibiogrammes

Montréal, Decarie Vigot, 1995, 322

40- Sanchez M. L., Ronald N. L. J.

Application of E-test technology ; Drug susceptibility testing and epidemiology.
E-test reference n°85 Spec. Microbiol. Antiinfect. Reseach center 1992 ; 1
 (2) : 1 – 3 .

41 – Sirot J.

Evaluation de l'activité antibactérienne des antibiotiques in vitro.

In : Le Minor L. Veron M.

Eds : Bactériologie médicale clinique

Flammarion Paris,, 1990, 297 - 315

42 – Soussy C. J.

Antibiotiques, généralités

In : Freney J. , Renaud F., Hansen W., Bollet C.

Eds : Précis de bactériologie clinique

Paris, éditions ESKA, 2000, 557 – 582

43 – Tenover F. C., Mohammed M. J., O'brien T., Williams R.

Ability od labotories to detect emerging antimicrobial resistance : Profiency testing and quality control results from the world health organization's external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing.l of clinical

J. clin. Microbiol. 2001 Jan., 39 (1) : 241 – 50

44 - Ueno T., Hiramatsu K., Nakano T.

Quality control for antimicrobial susceptibility test using correlation between MIC results [article in japonese]

Rinsho Byori. 2002 Jul; 50 (7) : 706 – 11

45 - Ueno T., Hiramatsu K., Nakano T.

An approach for the quality control in clinical microbiology labotory by antibiotics susceptibility.

[article in japonese]

Rinsho Byori. 2001 May; 49 (5) : 505 – 11

46 – Vandepitte J., Enbaek K. , Piot P. , Heuck C. C.

Bactériologie clinique : techniques de base pour le laboratoire.

Genève, OMS, 1994, 2 – 15

47 – WENDY A. KIEHIBAUCH J. A. HANNETT G. E.

*Use of National Committee for Clinical Laboratory Standarts Gudelines for
disk diffusion susceptibility testing in New York states laboratories*

J. clin. Microbiol. September 2000, 38 (9) : 3341 - 3348

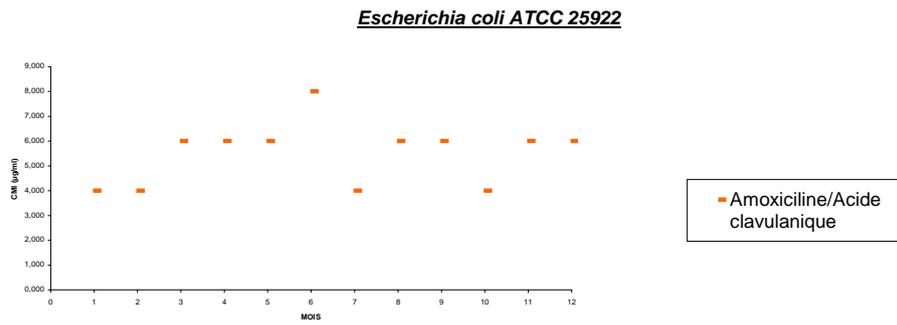


Figure 6 : Contrôle de qualité résultant du test d'amoxicilline/ acide clavulanique sur *E. coli* ATCC 25922

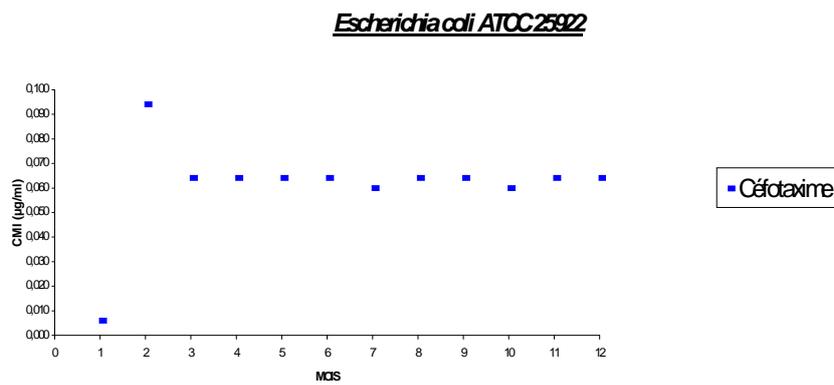
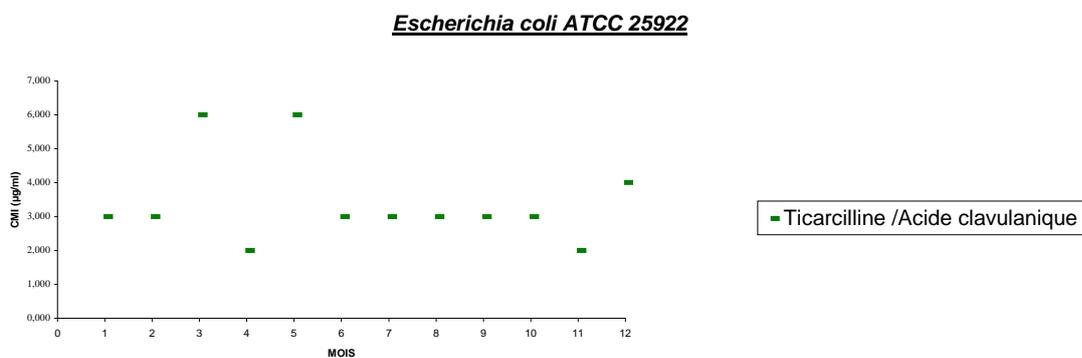


Figure 7 : Contrôle de qualité résultant du test de céfotaxime sur *E. coli* ATCC



25922

Figure 8 : Contrôle de qualité résultant du test de ticarcilline/acide clavulanique sur *E. coli* ATCC 25922

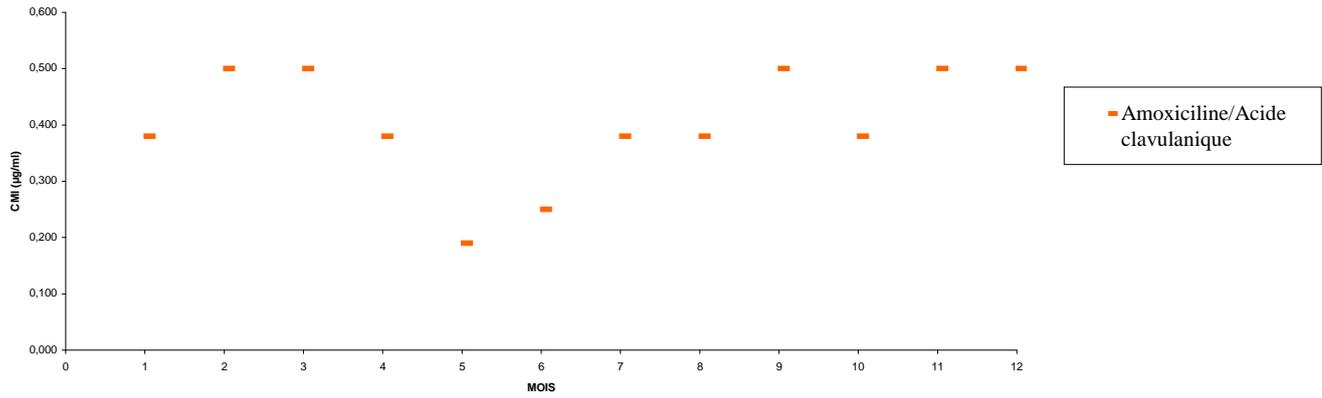
Staphylococcus aureus ATCC 29213

Figure 9 : Contrôle de qualité résultant du test d'amoxicilline/acide clavulanique sur *S. aureus* ATCC 29213

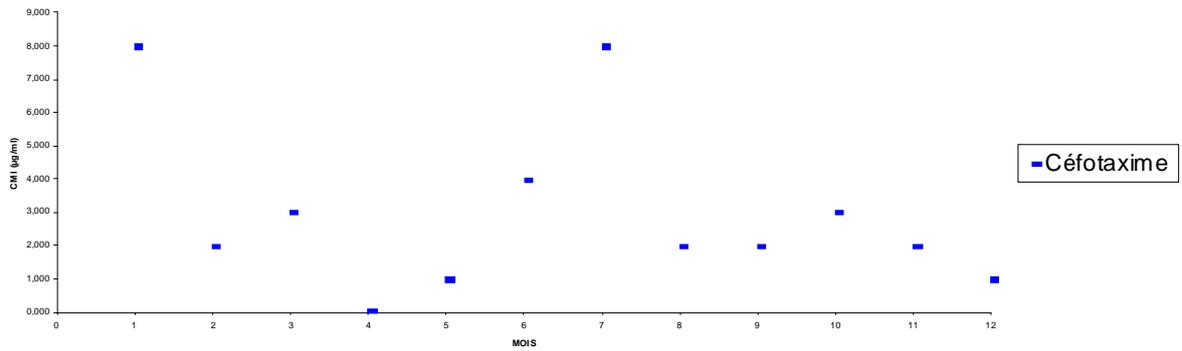
Staphylococcus aureus ATCC 29213

figure 10 : Contrôle de qualité résultant du test de céfotaxime sur *S. aureus* ATCC 29213

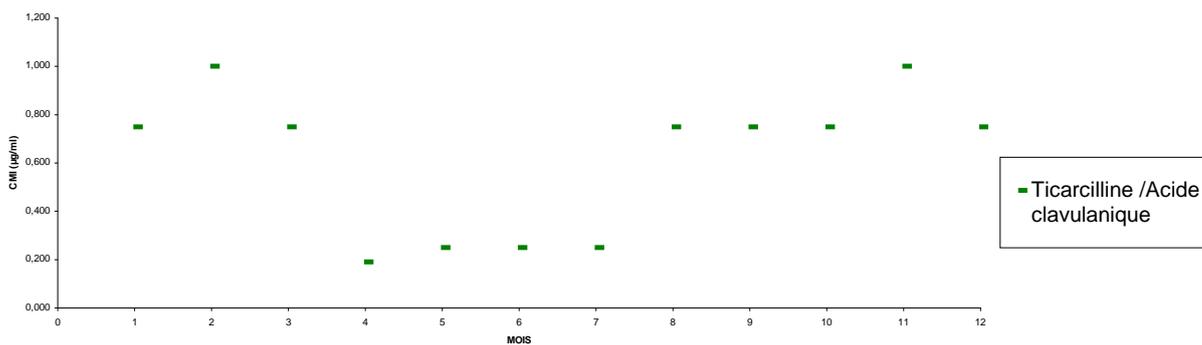
Staphylococcus aureus ATCC 29213

Figure 11 : Contrôle de qualité résultant du test ticarcilline/acide clavulanique sur *S. aureus* ATCC 29213