

# Accréditation en Bactériologie

Clefs de l'accréditation  
Point de vue d'un évaluateur technique

Delphine Mammès

Mars 2018

DU Paris VI

# Particularités secteur bactériologie

---

- Portée par tâches et non par analyse
    - Un examen composé d'une succession de différents sous processus (examen direct → résultat d'antibiogramme)
    - Techniques : manuelles ou automatisées selon l'activité et le laboratoire
  - Méthodes qualitatives principalement
  - Quantitatif (Cytologie urinaire GB GR)
  - Compétence du personnel+++
  - Gestion des CQI (différents par rapport aux autres familles)
  - Pour un même prélèvement, plusieurs sous familles (ex: PV : levures, bactério, Trichomonas)
  - Interrogation récente sur système multiplex (extension sur 3 sous familles pour une même technique?)
-

# Portée flexible

---

- Pré et post analytique pour toute la famille doit être maîtrisé
  - ***Comment maîtriser les processus lors des changements techniques?***
    - *Procédure de PF*
    - *Liste des examens à jour*
      - *SHREF05 : (pas d'extension si demande < 5mois ½ dans une famille ouverte à l'accréditation) Si famille non ouverte, voir avec le COFRAC (cas par cas))*
      - *Ajout possible y compris le jour de l'évaluation*
    - *A partir du moment où le labo est accrédité gestion des changements de réactifs (cartes, géloses...)*
-

**Achats (cahier des charges, ...),**

**Processus pré analytique (prélèvement, conditions de transport, tubes),**

- Revue des demandes

**Processus analytique :**

- Liste des méthodes analytiques employées,
- Formation/habilitation/réévaluation du personnel et responsabilité (validation),
- Conditions environnementales,
- Validation/vérification technique- CIQ, EEQ,
- Informatique (connexion et paramétrage),

**Processus post analytique :**

- Valeurs de références et interprétations -Validation biologique,
- Sérothèque et rajouts d'examens- Gestion du compte-rendu,

**Information clients et Cofrac,**

**Intégration des processus suivants dans le programme d'audit interne et la revue de direction :**

- Revue des méthodes révisées,
- Confirmation et autorisation d'emploi des méthodes reconnues,
- Ajout de méthodes dans la portée d'accréditation, Adaptation et développement de méthodes

- Si le laboratoire est déjà accrédité sur une partie des examens (ex: antibiogramme automatisé), il peut rajouter par la suite antibiogramme manuel, idem pour identification.
- Attention lors des changements de référence, des nouveaux réactifs utilisés : tout changement doit être maîtrisé et tracé.

# Documents de référence

---

- Norme 2012
  - SH REF 02 version 5
  - SH INF 50, SH REF 08
  - SH FORM 06 (liste)
  - SH GTA 02, 04, 06 (non opposables)
  - SH INF 19
  - QUAMIC-REMIC-SMQ du laboratoire
-

Code	Nature de l'échantillon biologique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarques (Limitations, paramètres critiques, ...)
BA1	Échantillons biologiques d'origine humaine Dispositifs implantables Culture bactérienne	Recherche, identification et numération d'éléments cellulaires, germes bactériens et autres éléments	Méthode de type qualitatif et quantitatif  Examen morphologique direct macro- et microscopique à l'état frais et/ou après préparation (coloration (GRAM, MGG, Ziehl, auramine...), culture, ...)	Méthodes reconnues (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	
BA2	Échantillons biologiques d'origine humaine Dispositifs implantables	Préparation en vue de recherche et identification de germes bactériens et/ou de bactéries spécifiques	Mise en culture (ensemencement)	Méthodes reconnues (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	La préparation est transférée à un autre site analytique du laboratoire, pour la poursuite de l'analyse (pas de résultat à ce stade)
BA3	Échantillons biologiques d'origine humaine Dispositifs implantables	Recherche, identification et numération d'éléments cellulaires, germes bactériens et autres éléments	Méthode de type qualitatif et quantitatif  Principe général des techniques :  - Cytométrie en flux, - Lecture optique - Analyse d'image	Méthodes reconnues (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	Ex. Cytologie urinaire

BA3 : Recherche identification et numération d'éléments cellulaires, germes bactériens et autres éléments	<b>ECBU</b>	urines	EC	2014	examen morphologique direct macroscopique et microscopique avant et/ou après culture et coloration (état frais, coloration de Gram, coloration de MGG)	34-AR-BTC- 7MO-025
	<b>coproculture</b>	selles	N	OPF2015		34-AR-BPL- 7MO-003
	<b>plaie</b>	sérosités	N	OPF2015		34-AR-BPL- 7MO-023
	<b>pus</b>	pus	N	OPF2015		34-AR-BPL- 7MO-024
	<b>ECBC/PDP/PBNP/LBA</b>	ECBC/PDP/PBNP/LBA	N	OPF2016		34-AR-BPL- 7MO-015
	<b>NN</b>	gastrique/ placenta/ périphérique NN	N	OPF2015		34-AR-BPL- 7MO-027
	<b>Drain, redon, KT, stérilet</b>	matériel	N	OPF2016		34-AR-BPL- 7MO-021 34- AR-BPL-7MO- 020
	<b>P.vaginal</b>	sécrétions	N	OPF2015		34-AR-BPL- 7MO-016
	<b>P.urétral</b>	sécrétions	N	OPF2015		34-AR-BPL- 7MO-016
	<b>liquide de ponction</b>	liquide de ponction	N	OPF2016		34-AR-BPL- 7MO-019 34-AR-BPL- 7MO-025
	<b>LCR</b>	liquide de ponction	N	OPF2016		34-AR-BPL- 7MO-028
	<b>biopsie</b>	biopsie	N	OPF2016		34-AR-BPL- 7MO-022
	<b>ORL</b>	sécrétions	N	OPF2015		34-AR-BPL- 7MO-029
	<b>Spermoculture</b>	sperme	N	OPF2016		34-AR-BPL- 7MO-002

# Personnel

- Habilitation (comment ont elles été faites?). Compétence et connaissance
    - Quizz, lecture lames Gram, lecture boites
    - Comparaison techniques automatisées et manuelles (ex: cytologie des urines).
    - Prélèvement: personnes autorisées selon qualification et réglementation (biologistes, infirmières, techniciens).
  - Veille documentaire et scientifique.
  - Maintien des compétences
    - Formation interne /externe
    - En cas d'absence prolongée
    - Validation du maintien des compétences
    - Ne pas oublier les biologistes
-

# Exemples d'écarts personnel

---

- L'habilitation lecture des boites n'a pas été tracée pour la nouvelle technicienne. Celle-ci est en poste et rend des résultats au jour de l'audit
  - La quantité de colonies sur les boites de culture est variable selon le personnel interrogé. De même, la lecture semi-quantitative lors des lectures des gram n'est pas définie.
-

# Locaux

- Pas trop vu par les évaluateurs du COFRAC sauf si dysfonctionnement grave: signalement à l'ARS.
- Penser au différents sites si besoin
- PSM (préservation des échantillons contre la contamination environnementale) (écarts existent)
- Germes groupe 3
- Arrêté 16 juillet 2007 confinement
- Protection des personnes contre les dangers connus
- Document « conception des analyses en LAB INRS ED 999 »
- Elimination déchets

# Exemples écarts locaux

- Le LBM ne traite pas l'ensemencement des ECBC sous PSM. Le laboratoire ne pratique aucun prélèvement d'environnement permettant de prouver l'absence de risque de contamination des échantillons

# Maitrise documentaire

---

- Comme dans les autres familles
    - Documents externes
    - Documents non gérés
    - Enregistrements
    - Feuilles de paillasse
    - Cahier de vie automates
  - Suivi du prélèvement (ED (cytologie, Gram), ensemencement, identification, test complémentaires, antibiogramme).
  - Scanbac ou autre système.
  - Modes opératoire associés (ex: milieux de culture à utiliser pour le prélèvement)
  - Vérification des saisies manuelles (gestion des risques)
-

# Exemple écarts documentation

---

- La fiche technique des cartes Vitek pour les gram- a changé. Le laboratoire n' est pas en mesure de montrer l' ancienne qui a été jeté. La date du changement n' a pu être retrouvée.
  - Aucune vérification du cochage scanbac, aucune analyse de risque n'a été réalisé
  - Mauvaise conservation des résultats bruts (<24 mois)
-

# Pré-analytique

---

- Délai pré-analytique
    - Utilisation de conservateurs (ex: ECBU sur borate de Na)
    - Milieu de transport (écouvillons, M<sub>4</sub>RT, e-swab)
    - Existence de dispositions
  - Température de transport
  - Transport inter sites avec ensemencement sur un des sites, gestion du délai d'incubation
  - Prélèvements (guide à l'usage des préleveurs)
    - Méthode et matériel
    - Renseignements cliniques
    - Manuel de prélèvement dématérialisé
  - Critères acceptation et rejet
    - NC tracées- Dérogations
-

# Revue de contrat

---

- Non spécifique à la bactériologie
  - Vérification que le laboratoire peut répondre aux exigences
  - Délai, renseignements cliniques, thérapeutiques
  - S'attacher à recueillir les renseignements cliniques
  - Contrat fournisseur, sous traitant, évaluation.
-

# Exemples d'écarts préanalytique

---

- Heure de prélèvement et heure de réception au laboratoire conservées un mois au laboratoire et non retranscrits dans le SIL sur le compte rendu
  - Il n'y a pas eu de dérogations réalisées suite à la réception d'échantillons à la mauvaise température de transport (13 mai 2015 : hémocultures à +4° C)
  - Le laboratoire a défini des délais d'acheminement pour les différents prélèvements bactériologiques. Or ce délai n'est pas surveillé.
  - Absence d'instructions concernant les délais et les températures pour les prélèvements bactériologiques sur écouvillon. (Ou acceptation des prélèvements sans réserve)
-

# Matériel

---

- Pas de spécificité bactériologie
  - Automates : ensemenceur, cytologie urinaire, identification+antibiogramme, spectro de masse...
  - Cahier des charges
  - Cahier de vie automate: maintenance – panne - procédure dégradée
  - Informatique: vérification des données, sécurité
  - Evaluation des fournisseurs critiques
-

# Réactifs

---

- Suivi des lots
  - **Maîtrise risques** : Chaque nouvelle formulation de trousse de réactifs prêts à l'emploi résultant de modifications de réactifs ou de procédure, un nouveau lot de fabrication ou une **nouvelle expédition** doit être vérifiée en termes de performance **avant** leur utilisation.
  - Fiche de stress
  - Fiches fournisseurs à jour
  - Gestion des périmés
  - Milieux de culture commercialisés: Certificat de compatibilité ou essai en interne (souches)
  - Milieux de culture fabriqués ou coulés en interne
-

# Type d'écarts réactifs et matériel

---

- Les géloses chromogènes sont stockés hors de leur carton de protection dans des réfrigérateurs à porte vitrée.
  - Pas de résultat retrouvé du passage de CQI après maintenance annuelle (changement de version) du Vitek
  - Défaut de traçabilité des maintenances du PSM
  - Absence de traçabilité de l'ouverture (utilisation) des lots de colorants pour le Gram
  - Absence de traçabilité des péremptions des réactifs après ouverture
-

# Maîtrise de la qualité des examens en bactériologie

---

- Ne nécessite pas que la maîtrise des CIQ et EEQ
  - Analyse des étapes critiques du processus avec le risque, la criticité, les moyens de maîtriser le risque.
  - A chacun d' établir cette analyse de risque en fonction de son activité
  - Permet de voir les étapes où il faut avoir un CIQ et la fréquence de passage.
-

# CIQ

A la différence d'autres domaines où la matrice est stable, en bactériologie, nous sommes confrontés à des **organismes vivants**

Finalité en bactériologie n'est pas tant de vérifier l'exactitude des multiples phénotypes rencontrés mais de s'assurer de la **pérennité des méthodes**

Permet de voir la **fidélité, absence de dérive des automates.**

## CONTRÔLE COMPÉTENCE TECHNIQUE – REACTIFS- FIABILITE DES RESULTATS

- Comment a été définie la série? En effet : Notion de séries différentes des autres disciplines (période de stabilité du système analytique). Fréquence de passage.
- Choix pertinents des souches (souches couvrant le panel des profils bactériens rencontrés le plus souvent, profil S et R) il existe des recommandations CASFM- SH GTA o6- fournisseur

# CIQ (2)

---

Utilisation des souches pour:

- Contrôles identification (contrôles galeries...)
  - Contrôles antibiogramme (contrôle disques –bandelettes Etest- milieu - galeries)
  - Contrôles tests biochimiques (contrôle réactifs)
  - Contrôle stérilité, coloration, inoculum, cytologie, surfaces, comparaison automates/manuelles, compétence personnel... mais ne pas faire de la « surqualité »
  - Contrôle **avant et après** maintenance
  - Définir critères de conformité
  - Utilisation possible de souches patients, d'EEQ
-

# EEQ (SH INF19)

---

- Définir ses besoins en fonction de son environnement
  - Différents programmes existent. Evaluation de plusieurs étapes analytiques. Pas un EEQ par prélèvement.
  - Problème de certains EEQ: « bêtes de cirques » :  
Contrôle d'exactitude - Formation
  - Communiquer les résultats au personnel concerné, actions correctives si besoin. (étude d'IMPACT)
  - Evaluation des fournisseurs d'EEQ
  - EEQ en aveugle: permet de vérifier la compétence des techniciens
-

# Type d' écart Contrôles

---

- Lors des résultats d' EEQ, si les z-scores sont supérieurs à 2, il n' existe pas de disposition pour une étude d' impact. L' EEQ est cependant repassé. Il n' existe pas de non conformités de tracées. Par ailleurs les résultats bruts des EEQ ne sont pas conservés .
  - Les EEQ ne sont pas passés comme des patients (enregistrement et traitement de l' échantillon différents)
  - Sous-traitance systématique des EEQ pour confirmer l' identification par spectrométrie de masse.
-

# Type d'écarts Contrôles

---

- Le laboratoire n'a pas mis en place de CIQ (cytologie manuelle) de comparaison inter opérateur (cytologie manuelle) ni d'évaluation des performances dans le temps (cyto manuelle et automatisée)
  - Les géloses CLED et CPS ne sont pas contrôlés par un CIQ.
  - Les EEQ(ou CIQ) sont passés sur un seul automate Bactec (le laboratoire a trois Bactec.
  - Absence d'actions correctives tracées en cas de résultat NC de résultat d'EEQ/CIQ.
  - Absence d'évaluation des fournisseurs d'EEQ
-

# Métrologie

---

- Définitions des besoins et de la criticité du matériel
  - Définition des EMT étuves, réfrigérateurs.
  - Pipettes de précision
  - CO<sub>2</sub>
  - Certificat étalonnage, incertitude étalonnage
  - Vérification par prestataire accrédité pour la prestation ou vérification en interne avec du matériel relié au SI.
-

# Exemple d' écart métrologie

---

- Absence de cartographie du réfrigérateur conservant les géloses. Le réfrigérateur BH6 contient des réactifs dans une zone non conforme.
  - Les EMT du réfrigérateur de secours ne sont pas conformes aux exigences du laboratoire (2-10° C)
  - Les chronomètres utilisés pour les étapes des identifications des mycobactéries ne sont pas identifiés. Certains chronomètres sont jugés critiques, mais la liste des équipements ne mentionne pas ceux-ci. Un chronomètre (identifié sur le rapport mais non identifié sur le matériel) servant à la coloration a été étalonné. Il n' existe pas de date d' étalonnage ni de prochain étalonnage sur celui-ci.
-

# Exemple d'écarts métrologie (suite)

---

- Les EMT pour toutes les grandeurs critiques ne sont pas définis. Il n'existe pas de trace pour la confirmation métrologique. Pas de prise en compte des incertitudes de mesure sur les sondes de température.
  - L'incubation sous CO<sub>2</sub> n'est pas maîtrisé.
  - L'étuve à 30° C a oublié d'être cartographié (audit de surveillance avec rajout de la coproculture en portée flexible).
-

# Vérification de méthodes préambule

---

- **QUAMIC 2014** Il ressort que pour la microbiologie, à l'exception de la cytologie urinaire automatisée et de la détermination de la charge virale (en biologie moléculaire), nous ne disposons que de méthodes qualitatives car les notions de justesse, d'intervalle de mesure et d'incertitude sont difficiles, voire impossibles, à déterminer en fonction d'un facteur supplémentaire de variabilité qui n'existe pas dans les autres disciplines : un micro-organisme est vivant. En effet, ce dernier présente une variabilité multifactorielle imprévisible (espèce, souche, état métabolique, nature de l'échantillon, traitement antibiotique, par exemple). Il en résulte une incertitude sur le résultat dont l'estimation est en pratique impossible.
-

# Vérifications de méthodes

---

- Bibliographie, limites acceptables: REMIC, sociétés savantes, publications, conférence de consensus, fournisseurs.
  - **Analyses de risques : compétence technique - 5M - évaluation des facteurs d'incertitude (facteurs à maîtriser, comment, incertitude résiduelle et impact sur le résultat) - diagramme d'ISHIKAWA,AMDEC.**
  - Automates (cytologie-identification/antibiogramme-ensemenceur)  
APTITUDE de l' automate à rendre des résultats exacts et reproductibles.
  - Techniques manuelles: analyses de risque - points critiques de l' analyse
-

# Vérification méthodes (2)

---

- Validation du processus analytique
    - Ensemencement (manuel - automatisé) QUALITATIF
    - Examen direct du prélèvement (manuel - automatisé) QUALITATIF et **QUANTITATIF pour cyto urinaire automatisé**.  
Cytométrie en flux - Lecture optique - Analyse d'image
    - Examen morphologique direct macro- et microscopique à l'état frais et/ou après préparation (coloration (GRAM, MGG, Ziehl, auramine...), culture, ...) = examen des prélèvements après coloration,
    - + lecture des boîtes (manuelle en général): méthodes QUALITATIVES, comparaison inter opérateur pour nombre UFC/ml (ECBU, ECBC)
-

# Vérification méthodes (3)

---

- Identification (manuelle - automatisée) QUALITATIVE
    - Différents dossiers à prévoir
    - Si plusieurs méthodes comparer
  - Antibiogramme (manuel - automatisé) QUALITATIVE selon le QUAMIC !!
    - Différents dossiers à prévoir
    - Si plusieurs méthodes comparer
    - -Evaluer les limites de la méthode automatisée (ex :détection BLSE / céphalosporinase dérégulée). Formaliser la conduite à tenir
-

# Vérification méthodes (4)

---

- E test METHODE QUALITATIVE.
  - Autres lignes: génotypage, identification par PCR, inoculation animal
  - Validation/vérification de chaque sous-processus.
  - Processus complexe avec les différents sous-processus.
-

# Vérification méthodes (5)

---

- Faire des dossiers complets
  - Cytologie automatisée: CV, limites acceptables. Surveillance des CV à long terme
  - Date autorisation d' aptitude
  - Expliquer quand ce n' est pas conforme
  - Insérer les résultats des CIQ et des EEQ
-

# Vérification méthodes (6)

Ensemencement manuel	Analyse de risque = évaluation des incertitudes	
Ensemencement automatisé	Analyse de risque	Suivi recommandations fournisseur Répéta-repro- contamination? Comparaison avec techniques manuelles
Examen micro et macroscopique	Analyse de risque	Colorateur (suivi recommandation fournisseur). Contamination, nécessité d'un contrôle ? Examen macroscopique: comparaison UFC/ml

Cytologie manuelle	Analyse de risque (agitation , volume dans cellule, temps de repos avant lecture...)	Répéta, repro, comparaison interopérateur
Cytologie automatisée	Analyse de risque	Suivi recommandation fournisseur Répéta, repro, contamination, sensibilité, linéarité, concordance au seuil avec techniques manuelles, comparaison avec techniques manuelles
Identification- Antibiogramme automatisé	Analyse de risque	Suivi recommandation fournisseur comparaison avec autres méthodes
Antibiogramme manuel par diffusion	Analyse de risque	Répéta? repro? contamination- comparaison méthodes sur des ATB pertinents

# Exemples d'écarts analytique

---

- Identification ou antibiogramme sur cultures 48h (différence avec recommandations fournisseurs) (dimanche - JF)
  - Absence de suivi recommandation fournisseur (passage en portée B): identification à partir de gélose non validée
  - Lecture des urines le lendemain matin (Temps d'incubation pas systématiquement respecté notamment pour les échantillons stériles ou paucimicrobiens)
  - Le laboratoire n'a pratiqué aucune véritable vérification sur site des deux automates d'hémocultures.
  - Les CV utilisés pour la vérification de méthodes sur l'automate de cytologie urinaire n'ont pas été explorés depuis la vérification de méthode initiale
-

# Exemples d'écarts analytique

---

- Conduite à tenir en cas d'urines stériles avec leucocytes mal définie (germes fragiles, germes difficiles à identifier).
  - Colistine rendu pour les *P. aeruginosa* contrairement aux recommandations du CASFM.
  - La différence de sensibilité à la ciprofoxacine pour les salmonelles issus d'hémocultures ou de coproculture n'est pas appliquée (CMI cipro selles 0.5 – 1 (inf ou égale à 0.5 S, > 1 R) CMI cipro hémoc 0.06-0.06 (inf ou égale à 0.06 S, > 0.06 R))
  - La cytologie urinaire est indiquée sur le compte rendu pour les ECBU sur sonde contrairement aux recommandations.
-

# A long terme

---

- Utilisation des CIQ et EEQ
  - Compétence à réévaluer
-

# Post analytique et Compte rendu

---

- Vérification retranscription manuelle +++
  - Commentaire et interprétation: Algorithme décisionnel
  - Critères alerte, gestion de l'urgence.
  - Prestations de conseil (concerne le pré et post analytique), interprétations
    - Valeur ajoutée
    - Tracer cette prestation
-

# Exemples d'écarts post analytique

---

- La validation biologique au niveau du SIL des résultats de mycobactéries est réalisée par les biologistes, mais aussi par les référents techniques (qui ne sont pas biologistes).
  - Absence de disposition pour conservation prélèvements, boîtes en post analytique
  - Absence de méthode sur les comptes rendus de bactériologie. Absence d'interprétations
  - Aucune mention sur le compte rendu lorsque la cytologie n'est pas faite sur l'automate.
  - Utilisation de la marque Cofrac sur un CR comportant que des analyses non accréditées (ECBU seul)
-

# Évaluations et audits

---

- Revue des prescriptions (correspond aux demandes)
  - Revoir périodiquement volumes des échantillons, son dispositif de prélèvement et ses exigences en matière de conservation du sang
  - Audit interne
-

# Types d' écart divers

- Pas de vérification saisie manuelle des résultats lors de la transcription des antibiogrammes des anaérobies (sur gélose).
- Les différents centres nationaux de référence et le laboratoire départemental ne sont pas évalués.
- L' automate BACTALERT possède un thermomètre de contrôle des températures dont le relevé est quotidien. Cependant ce thermomètre est toujours situé dans le même tiroir de l'appareil (8 tiroirs au total)
- Hémocultures : Le volume acceptable sur 24h n'est pas contrôlé contrairement aux dispositions, notamment sur les hémocultures solitaires

- Lors de l'évaluation il est constaté que pour la réalisation d'une recherche Cytobactériologique des urines, il n'est pas donné au patient la fiche explicative des modalités de recueil. De plus cette même fiche n'est pas associée aux flacons distribués dans les pharmacies ou aux patients réalisant le recueil à domicile .De plus il existe une discordance entre le délai d'acheminement des urines affiché sur les différents supports (1h maximum ou 2h maximum) Lors de l'évaluation il est constaté que des urines recueillies sur flacon boraté sont en quantité insuffisante et donc devraient être refusées. Sur les deux échantillons il existe une non-conformité pour seulement une d'entre elle.

Un flacon d'hémoculture de pédiatrie a été accepté sans non-conformité chez un patient né en 1938

435 labo accrédités en bactériologie (mars 2018)  
(une à plusieurs lignes de portée)

Merci de votre attention...