

Université Pierre et Marie Curie
Paris 6

MÉMOIRE
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE
DE BIOLOGIE MÉDICALE »

MISE EN PLACE DE CONTRÔLES INTERNES DE QUALITÉ EN
BACTÉRIOLOGIE
SUR LA BASE D'UNE ÉTUDE DE CRITICITÉ

Gaudin Florian
2012-2013

NOTE AU LECTEUR

Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire « Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation.

Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs.

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du DU concerné.



GAUDIN Florian

Technicien de Laboratoire

Laboratoire de Bactériologie

Service de Microbiologie

Groupe Hospitalier Necker Enfants-Malades

149 rue de Sèvres

75015 PARIS

REMERCIEMENTS

A toutes les personnes qui m'ont soutenu pendant cette année et qui ont rendu possible ce travail.

Un grand merci à Agnès Ferroni Praticien Hospitalier au laboratoire de bactériologie pour ses précieux conseils et le temps qu'elle a su me consacrer.

A Christophe Feigueux Cadre supérieur de santé, aujourd'hui consultant, pour m'avoir initié à la qualité, permis de suivre cette formation et pour m'avoir toujours soutenu et témoigné beaucoup de confiance.

Aux responsables et intervenants du DU « Assurance Qualité au laboratoire de Biologie Médicale » pour la qualité de la formation dispensée.

A l'ensemble du laboratoire de Bactériologie de l'hôpital de Necker et surtout mes collègues de l'équipe technique qui m'ont permis de dégager du temps pour la réalisation de ce travail. Un merci particulier à Dominique Germain et à Justine Michel pour leur aide précieuse.

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	- 7 -
2. CONTEXTE	- 8 -
2.1 PRÉSENTATION DU LABORATOIRE	- 8 -
2.2 LE LBM ET LA QUALITÉ	- 8 -
2.3 ORGANISATION DU LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE	- 9 -
2.4 LA QUALITÉ AU LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE	- 10 -
3. STRATÉGIE DE MISE EN PLACE DES CIQ	- 11 -
3.2 RECENSEMENT DES PROCESSUS ANALYTIQUES, DES RÉACTIFS ET DE LEURS FACTEURS DE RISQUE	- 12 -
3.2.1 RÉACTIFS	- 12 -
3.2.2 PROCESSUS ANALYTIQUES	- 12 -
4. ETUDE DE CRITICITÉ	- 17 -
4.2 MÉTHODE AMDEC	- 17 -
5. ANALYSE DE L'ÉTUDE DE CRITICITÉ	- 25 -
5.2 RÉACTIFS	- 25 -
5.3 PROCESSUS ANALYTIQUE	- 25 -
6. MISE EN PLACE DES CIQ	- 27 -
6.1 ACTUELLEMENT AU LABORATOIRE :	- 27 -
6.2 CIQ À METTRE EN PLACE	- 27 -
6.3 PLAN D'ACTION	- 28 -
6.3.1 CIQ SUR L'EXAMEN DIRECT AVANT ET APRÈS COLORATION DE GRAM OU MGG	- 28 -
6.3.2 CIQ SUR LA CULTURE	- 29 -
6.3.3 CIQ SUR LA COLORATION DE GRAM	- 29 -
6.3.4 CIQ SUR LES TESTS D'ORIENTATIONS	- 29 -
6.3.5 CIQ SUR L'IDENTIFICATION BACTÉRIENNE	- 30 -
6.3.6 CIQ SUR L'ANTIBIOGRAMME	- 30 -
CONCLUSION	- 32 -

GLOSSAIRE

AP-HP : Assistance Publique Hopitaux de Paris

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

COFRAC : Comité Français d'accréditation

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

AMDEC : Analyse des modes de défaillance et leur criticité. C'est un outil gestion de la qualité. C'est une évaluation de la criticité des modes de défaillance permettant leur hiérarchisation.

5M (Diagramme d'Ishikawa) : Diagramme de causes et effets, d'Ishikawa, ou 5M est un outil développé par Kaoru Ishikawa utilisé dans la gestion de la qualité. Il représente de façon graphique les causes aboutissant à un effet.

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CIP : Collection de l'Institut Pasteur

ATCC : American Type Culture Collection

MALDI-TOF-MS : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight - Mass Spectrometry. C'est un spectromètre de masse qui couple une source d'ionisation/désorption laser assistée par une matrice et un analyseur de temps de vol.

REMIC : Référentiel en Microbiologie médicale.

EUCAST : European Committee on antimicrobial susceptibility testing.

ATB : Antibiogramme

CMI : Plus petite concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber in vitro la croissance d'une souche bactérienne.

1. INTRODUCTION

Depuis l'ordonnance n° 2010-49 du 13 Janvier 2010 (1) relative à la biologie médicale, le monde du laboratoire est en pleine mutation. Créée afin de renforcer la biologie médicale au sein du parcours de soins et mettre en place une nécessaire traçabilité des examens de biologie médicale, cette ordonnance rend obligatoire l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) selon la norme NF EN ISO 15189. Un tel niveau de qualité permet de s'assurer que les laboratoires ont mis en place une organisation optimale et sont titulaires d'une compétence prouvée pour la réalisation des examens de biologie médicale.

La norme dans les chapitres 4.9, 4.12 et surtout 5.6 relatifs à l'assurance qualité des procédures analytiques, dit que « le laboratoire doit évaluer l'impact des processus de travail et défaillances potentielles sur la sécurité des résultats d'analyse » et exige du laboratoire la conception de « systèmes de contrôles internes de qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue » (2). Les notions de « contrôle qualité » et « maîtrise des risques » sont des principes clés de la qualité.

La bactériologie étant une discipline particulière où les techniques manuelles sont encore largement majoritaires et où le travail sur du vivant impose une grande variabilité des résultats, la notion de « qualité prévue » est plus difficile à définir que pour un paramètre dosé quantitativement par un automate. Comme le COFRAC le décrit dans le guide technique d'accréditation SH GTA 06 (3) relatif aux contrôles de qualité, la maîtrise de la qualité analytique en bactériologie va essentiellement reposer sur une analyse des risques afin d'établir les points critiques du processus. Cette analyse est un préalable à une stratégie de mise en place des contrôles de qualité.

L'objectif de ce mémoire est de réaliser une analyse de risque des processus analytiques afin de mettre en place les contrôles internes de qualité (CIQ) les plus efficaces et adaptés à l'activité du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Necker Enfants-malades.

Pour effectuer ce travail nous commencerons par recenser les différents processus analytiques et réactifs utilisés au laboratoire de bactériologie, puis nous réaliserons une étude de criticité pour dégager les principaux points à maîtriser. Enfin nous détaillerons la mise en place concrète des CIQ les plus adaptés à l'activité.

2. CONTEXTE

2.1 Présentation du laboratoire

L'Hôpital Universitaire Necker-Enfants malades est l'un des 12 groupes hospitaliers de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP). Né en 1926 du regroupement de l'hôpital Necker et de l'hôpital des Enfants malades c'est en son sein qu'a été inventé le stéthoscope et où a été réalisée la première greffe de rein. Aujourd'hui il dispose de 400 lits consacrés à la pédiatrie et 200 lits pour le pôle adulte. Plus de 4000 personnes travaillent dans cet hôpital pédiatrique de référence en France et son recrutement est très large puisque 20 % des patients hospitalisés viennent de province ou de l'étranger. Il est aujourd'hui le centre de référence de nombreuses maladies rares.

Le LBM fait partie du pôle Biologie et Produits de santé qui est l'un des 9 pôles du GHU. Il compte 9 unités dont la Microbiologie (Bactériologie, Virologie, Myco-Parasitologie et Hygiène hospitalière). Pour l'année 2012 la Microbiologie a réalisé 386 000 actes soit 35.8 millions de B/BHN avec une équipe de 60 personnes dont 21 techniciens de bactériologie/myco-parasitologie/mycobactériologie et 12 de virologie. Le travail présenté ici concerne uniquement la bactériologie.

2.2 Le LBM et la qualité

Le LBM est très engagé dans la démarche d'accréditation et s'est organisé en cellule qualité depuis décembre 2009. Elle regroupe toutes les personnes du pôle investies dans la démarche d'accréditation (biologistes, techniciens, cadres, ingénieurs). Elle se réunit une fois par mois pour harmoniser l'organisation de la qualité dans les différentes unités du laboratoire, les soutenir et les accompagner. Le dossier d'accréditation initiale a été déposé en mai 2013, comprenant une demande d'accréditation partielle pour certaines analyses appartenant à 3 secteurs distincts du LBM : la biologie moléculaire en microbiologie (bactériologie+ virologie), la génétique et les explorations fonctionnelles. Un calendrier d'accréditation progressive des différentes unités du laboratoire a été défini, l'objectif étant l'accréditation totale du LBM pour 2016. La bactériologie devrait être audité par le COFRAC en 2015. Chaque unité a mis en place son organisation propre pour la gestion de la qualité en nommant des Référents qualités (RAQ). En Microbiologie 8 RAQ ont ainsi été nommés (2 Praticiens Hospitaliers, 1 Cadre de santé, 1 ingénieur, 4 Techniciens de

laboratoire). L'ensemble du personnel est également sensibilisé et investi sur la démarche qualité en participant par exemple à la rédaction de procédures.

Le LBM participe également aux réunions du Comité de Pilotage (COFIL) de l'APHP et a pris part fin 2012 début 2013 aux audits croisés inter-APHP.

2.3 Organisation du laboratoire de bactériologie

Le laboratoire de bactériologie est ouvert en continu, cependant entre 19 heures et 06h30 seuls les prélèvements urgents sont pris en charge au niveau du Laboratoire à Réponse Rapide (LRR) qui regroupe également l'Hématologie et la Biochimie. Le LRR ne se situe pas dans le même bâtiment que le laboratoire de bactériologie de jour qui nous intéresse ici.

Les prélèvements arrivent au laboratoire par un système pneumatique ou par pédibus et sont orientés (après enregistrement par la réception) sur l'un des trois secteurs techniques. Les trois secteurs du laboratoire de bactériologie sont organisés en fonction du service prescripteur de l'analyse :

- Le secteur 1 s'occupe de tous les prélèvements issus des services adultes de l'hôpital
- Le secteur 2 s'occupe des prélèvements des services pédiatriques et des urgences
- Le secteur 3 s'occupe de la maternité, de la néo-natalité et de la cardiologie.

L'ensemble des techniciens tourne de manière bimestrielle sur ces secteurs. Le travail est organisé de la même manière dans les 3 secteurs : ensemencement des prélèvements, lecture des boîtes, réalisation d'identifications et antibiogrammes le cas échéant. L'ensemble du laboratoire de bactériologie dispose des automates suivants :

- 2 automates de coloration de lames pour les GRAMS: AEROSPRAY® GRAM (ELITech Biomedical Systems)
- 2 **SIRscan® 2000** (i2A) pour l'incubation et la lecture des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé. Ils interprètent également les antibiogrammes grâce à un système expert et sont connectés avec le SIL du laboratoire (logiciel Glims de la société MIPS).
- 1 **BacT/ALERT® 3D** (bioMérieux) pour l'incubation et la lecture des flacons d'hémoculture. L'automate détecte la positivité ou la négativité des flacons et est également connecté avec le SIL.

- 1 spectromètre de masse **LT2-Andromas®** (Andromas) de type MALDI-TOF pour l'identification des germes bactériens isolés.

2.4 La qualité au laboratoire de bactériologie

L'équipe de Bactériologie a intégré la cellule qualité dès sa mise en place. Des réunions sont effectuées de façon bimensuelle au sein de l'équipe qualité pour fixer des objectifs permettant de faire avancer le secteur de microbiologie dans la démarche. Ainsi depuis la mise en route de cette organisation un travail conséquent a été effectué pour faire avancer le laboratoire à tous les niveaux. Au niveau analytique qui nous intéresse ici, les procédures du laboratoire ont été en grande partie réécrites ou mises à jour pour se mettre en conformité avec les exigences de la norme, des contrôles de qualité externe volontaires (en plus de ceux prévus annuellement par l'ANSM) ont été mis en place en bactériologie « classique » et en biologie moléculaire. Néanmoins, les spécificités de la discipline font que lorsqu'il s'est agi de réfléchir sur la meilleure manière de mettre en place des contrôles internes de qualités (CIQ), de nombreuses difficultés ont été mises à jour.

Nous avons commencé par mettre en place un CIQ mensuel de l'antibiogramme par diffusion en milieu solide en suivant les recommandations (4) du CA SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie). Il consiste à tester 5 souches de références dont les diamètres d'inhibition à différents antibiotiques et les profils de résistance sont connus. Ce contrôle est un bon moyen de vérifier le bon déroulement de la réalisation des antibiogrammes, mais le processus analytique dans son ensemble doit être maîtrisé. Il est donc nécessaire de mettre en place des CIQ ciblés sur les points critiques et couvrant l'ensemble du processus.

Depuis la mise en place de ces contrôles d'antibiogramme dans notre laboratoire, le COFRAC a émis un guide technique d'accréditation, le SH GTA 06, consacré aux contrôles de qualité en biologie médicale. Ce document nous a confortés dans notre démarche concernant la nécessité d'un CIQ pour l'antibiogramme, qui est l'analyse biologique la plus critique en Microbiologie car soumise à de nombreuses variations. Ce document va nous servir de base de travail pour la mise en place d'autres CIQ adaptés à notre laboratoire.

3. STRATÉGIE DE MISE EN PLACE DES CIQ

Comme le précise la norme dans le chapitre 5.6.1 (2) pour la conception de systèmes de CIQ « il convient de veiller particulièrement à éliminer les erreurs susceptibles de se produire dans le processus de traitement des échantillons, des prescriptions, des analyses, des comptes rendus, etc. ». Le COFRAC précise dans le document de référence SH REF 02 (5) au chapitre 5.6.1 que « le LBM met en œuvre des CIQ [...] à une fréquence définie en fonction d'une analyse bénéfice/risque des spécifications des méthodes ou en cas d'intervention sur le processus analytique. ». Le chapitre 5.6.2 précise que le LBM « identifie les facteurs susceptibles d'influencer le résultat de mesure (analyse de risque) »

Ainsi, il paraît nécessaire de faire une analyse complète du processus analytique avant de procéder à une étude de criticité. Ces deux outils nous permettront de mettre en évidence les points critiques du processus analytique. Nous serons alors à même de mettre en place des mesures visant à réduire la probabilité d'apparition des dysfonctionnements, ainsi que des CIQ adaptés.

C'est cette stratégie de mise en place des CIQ en bactériologie qui est décrite dans le SH GTA 06. Elle utilise l'Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité (AMDEC) qui est un outil utilisé dans tout domaine en gestion de la qualité. Il est intéressant car il va permettre d'analyser l'ensemble des réactifs et processus analytiques pour mettre en évidence les points sensibles à maîtriser.

La mise en place de cette méthode doit d'abord comprendre un recensement de l'ensemble des processus analytiques et des réactifs utilisés au laboratoire. Il s'agit ensuite d'établir la liste de tous les facteurs de risques pouvant influencer sur la qualité analytique, en s'aidant de la méthode des 5M.

L'application de l'AMDEC pour chacune des causes de dysfonctionnement nous permettra de les classer hiérarchiquement selon leur criticité. Les points identifiés ainsi comme les plus sensibles à maîtriser au laboratoire seront ceux qui nécessiteront la mise en place de CIQ.

3.2 Recensement des processus analytiques, des réactifs et de leurs facteurs de risque

3.2.1 Réactifs

Nous avons commencé par faire la liste des réactifs utilisés au laboratoire. Ils sont bien sur multiples mais peuvent être regroupés en 4 grandes catégories.

- Les milieux de culture solides et liquides
- Les disques d'antibiotique et bandelettes CMI pour les antibiogrammes par la méthode de diffusion
- Les réactifs d'automate (colorateurs et Spectromètre de masse)
- Les réactifs pour techniques manuelles du processus analytique (Oxydase, Indole, Catalase, test d'agglutination de *Staphylococcus aureus*, céfinase, test d'agglutination de *Streptococcus pneumoniae*).

Pour l'ensemble de nos réactifs, les principaux facteurs de risque sont :

- L'absence des documents qualités :
- le non-respect des délais et/ou conditions de transport
- le non-respect du délai et de la température de conservation au laboratoire
- la survenue d'une anomalie sur un lot (réactovigilance)

Pour tous les réactifs du laboratoire, il est nécessaire de vérifier auprès du fournisseur l'existence de fiches qualités et de fiche de stress. Les fiches qualités sont par exemple le certificat de conformité du lot ou de libération du lot, et la fiche de stress qui garantit (par des tests de stress de température par exemple) la stabilité des réactifs pendant le transport et la période de conservation en dehors du laboratoire.

Pour les milieux de culture commercialisés, le SH-GTA-01 (6) précise au paragraphe 6.6 que le certificat de conformité du fournisseur est suffisant. Pour le cas où des milieux de cultures sont fabriqués sur place, il est nécessaire d'établir un plan qualité pour chaque réactif concerné. Dans notre laboratoire aucun milieu n'est fabriqué sur place.

3.2.2 Processus analytiques

Nous avons identifié 5 processus analytiques principaux dans notre laboratoire de bactériologie. Ils correspondent aux portées d'accréditations pour notre famille présentées dans le SH INF 50 (7). Nous avons réalisé pour chacun de ces

processus, le diagramme d'Ishikawa (5M) correspondant afin de mettre en évidence les facteurs de risques qu'ils induisent (figures 1, 2, 4, 5 et 6).

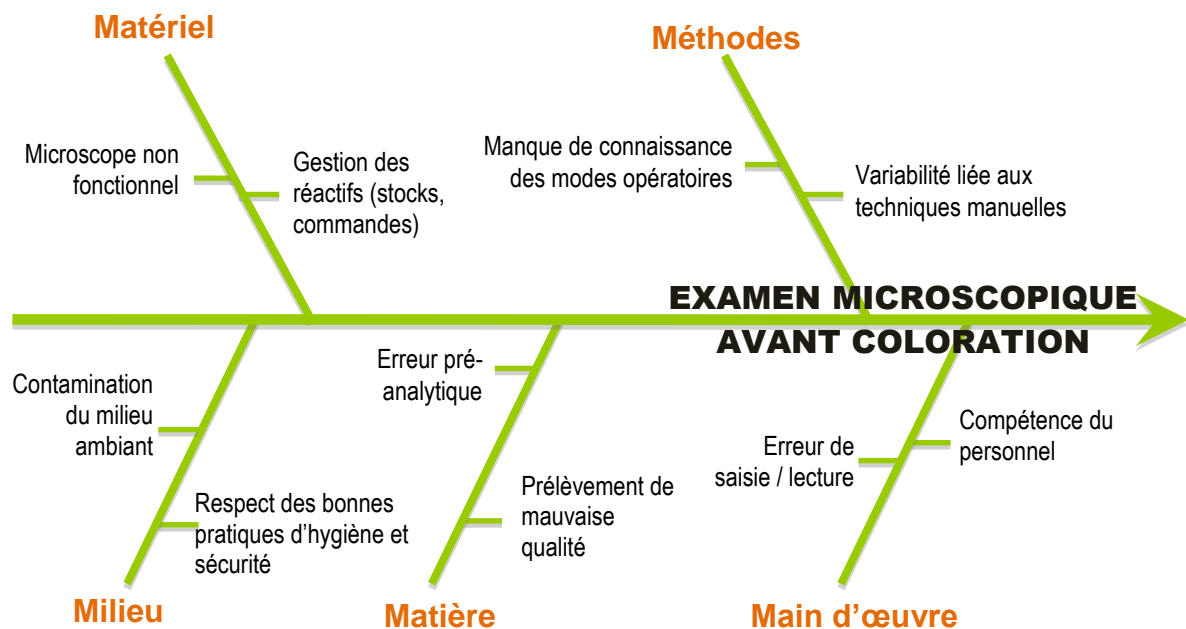
- **Examen direct microscopique (Cytologique et bactériologique) avant coloration**

L'examen direct d'un liquide biologique à l'état frais (sans coloration) comprend :

- Soit une recherche de la présence de microorganismes (bactéries, levures) entre lame et lamelles au microscope (objectif x40)
- Soit une appréciation quantitative des cellules nucléées et des hématies sur une cellule de comptage (objectif x40), associée à la recherche de germes.

Au laboratoire, l'examen direct avec cytologie manuelle est effectué en cellule de Kova. Dans le cas des urines les hématies et leucocytes sont rendus en paliers : $<10^4$, 10^4 , 10^5 , 10^6 ou $>10^6$ éléments par mm^3 . Pour les ponctions la cytologie effectuée est rendue en nombre exact d'éléments/ mm^3 . Cet examen direct sert également à rechercher les champignons et tout autre élément présent dans le liquide biologique (ex : cristaux).

Figure 1: 5M de l'examen direct microscopique



- **Examen direct microscopique après coloration, après et/ou avant culture**

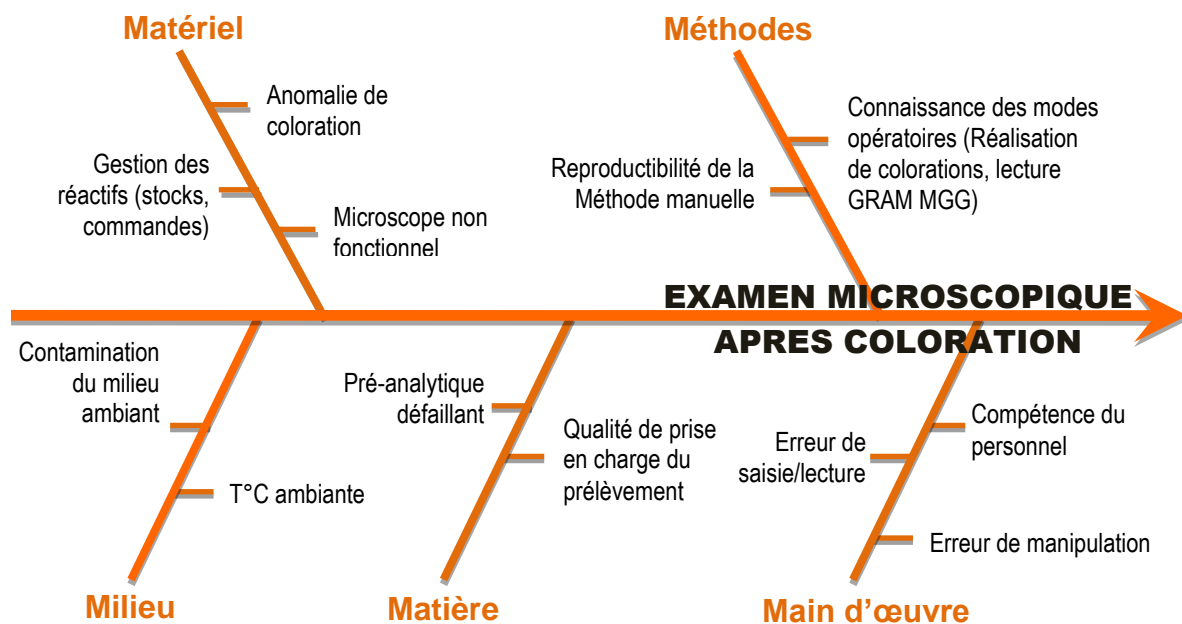
L'examen direct d'un prélèvement biologique après coloration comprend, pour les prélèvements le nécessitant (selon procédure) :

- Une coloration de May Grunwald Giemsa (**MGG**) qui sert à effectuer

- l'appréciation quantitative des polynucléaires neutrophiles pour les prélèvements le nécessitant (expectorations par exemple)
- une formule leucocytaire pour certains liquides (LCR, ponctions, etc.) en fonction du nombre de leucocytes observés à l'examen direct avant coloration (>20 pour les ponctions).
- Une coloration de **Gram** pour mettre en évidence les microorganismes (bactéries, levures)

La coloration de Gram est également faite sur les cultures bactériennes pour orienter l'identification de germes rares. La coloration MGG quant à elle peut aussi servir à mettre en évidence la présence de levures et champignons ou la présence de tout type de cellules caractéristiques pour les prélèvements respiratoires et biopsies.

Figure 2 :5M de l'examen microscopique après coloration



▪ Culture bactérienne

Les techniques utilisées au laboratoire pour l'ensemencement et l'incubation des prélèvements sont issues des recommandations (8) du Référentiel en Microbiologie médicale (REMIC). Tous les prélèvements ne sont pas forcément ensemencés de la même manière. En fonction de leur type ils peuvent nécessiter un prétraitement (broyage pour les biopsies, fluidification pour les expectorations, etc.). Les milieux de culture à ensemercer et les conditions d'incubation (température, durée, atmosphère) de ces milieux sont également fonction du type de prélèvement. Au laboratoire, des procédures précisent toutes les modalités d'ensemencement par

type de prélèvements. Les techniques d'ensemencement varient elles aussi mais la plus fréquente reste néanmoins la méthode des quadrants (figure 3).

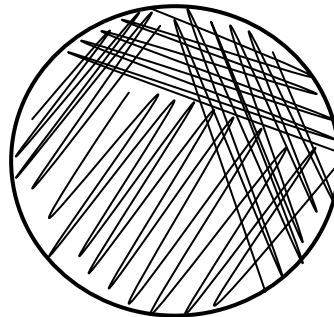
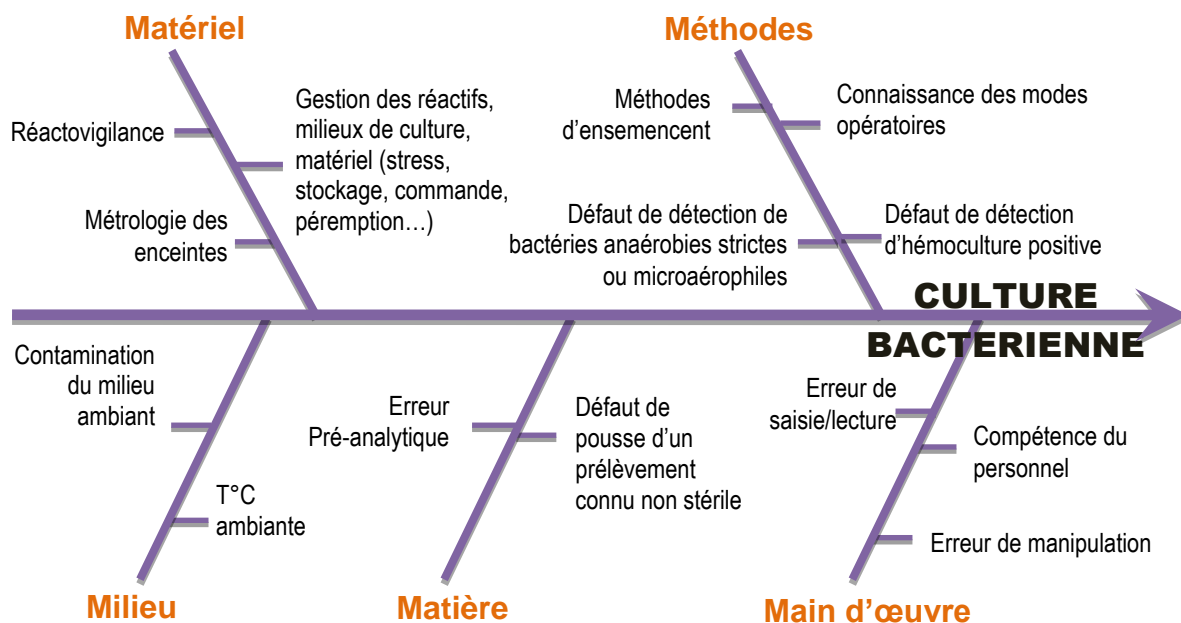


Figure 3 : Schéma classique de l'ensemencement

Certains prélèvements comme le sang et les prélèvements précieux (biopsies os, liquides articulaires, etc.) sont incubés en flacons d'hémocultures dans un bouillon riche qui permet une détection avec plus de sensibilité qu'une culture sur milieux gélosés. Ces flacons d'hémoculture sont incubés dans un automate le BacT/alert® 3D, qui va lire les flacons à intervalles réguliers et détecter une éventuelle présence bactérienne.

Figure 4 : 5M de la culture bactérienne

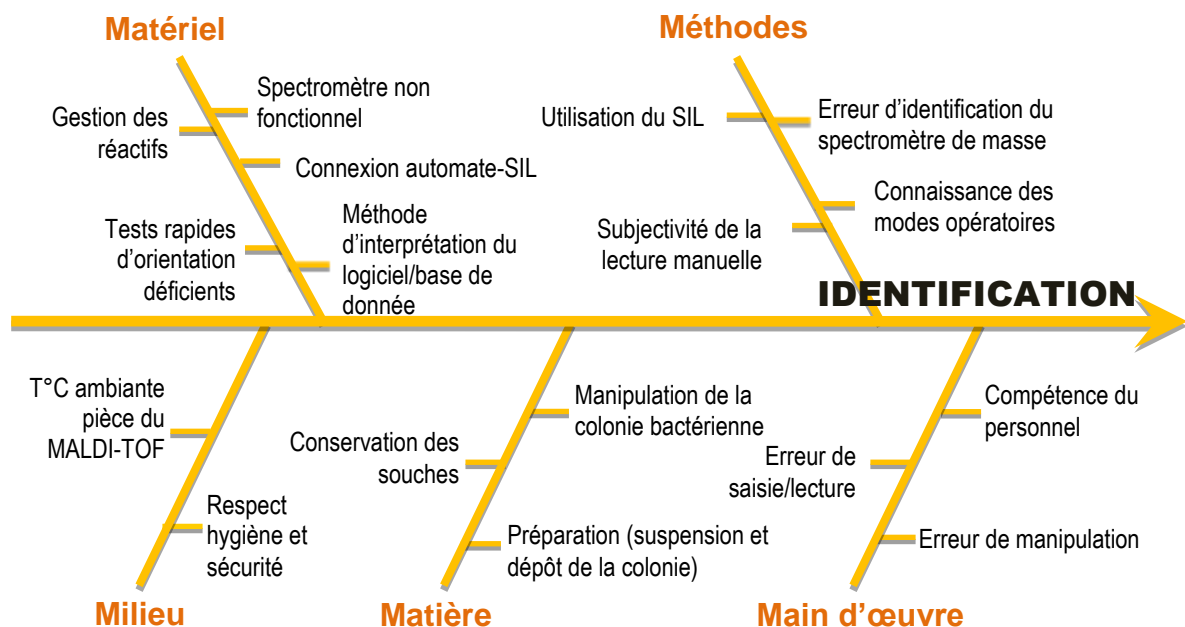


▪ **Identification :**

L'identification des bactéries se fait en se basant sur les caractères phénotypiques (macroscopie, aspects des colonies), des tests rapides, et par spectrométrie de masse. Au laboratoire, l'identification bactérienne est une étape encore très manuelle

du processus puisqu'elle repose en grande partie sur le technicien qui l'effectue. Lors de la lecture des boîtes c'est lui qui va, en accord avec le biologiste responsable, constater la positivité ou non de la culture bactérienne. Si elle est positive il doit définir si les germes observés sont potentiellement pathogènes, nécessitant une identification complète et un antibiogramme. Cette décision sera orientée en fonction du type de prélèvement, de l'aspect phénotypique de la souche bactérienne, du contexte, du nombre de colonies et des tests rapides d'orientation (par ex : Oxydase, Indole, Catalase, test d'agglutination de *Staphylococcus aureus*, cefinase, test d'agglutination de *Streptococcus pneumoniae*). L'identification complète du germe sera faite grâce à l'analyse par spectromètre de masse (MALDI-TOF).

Figure 5 : 5M de l'identification bactérienne

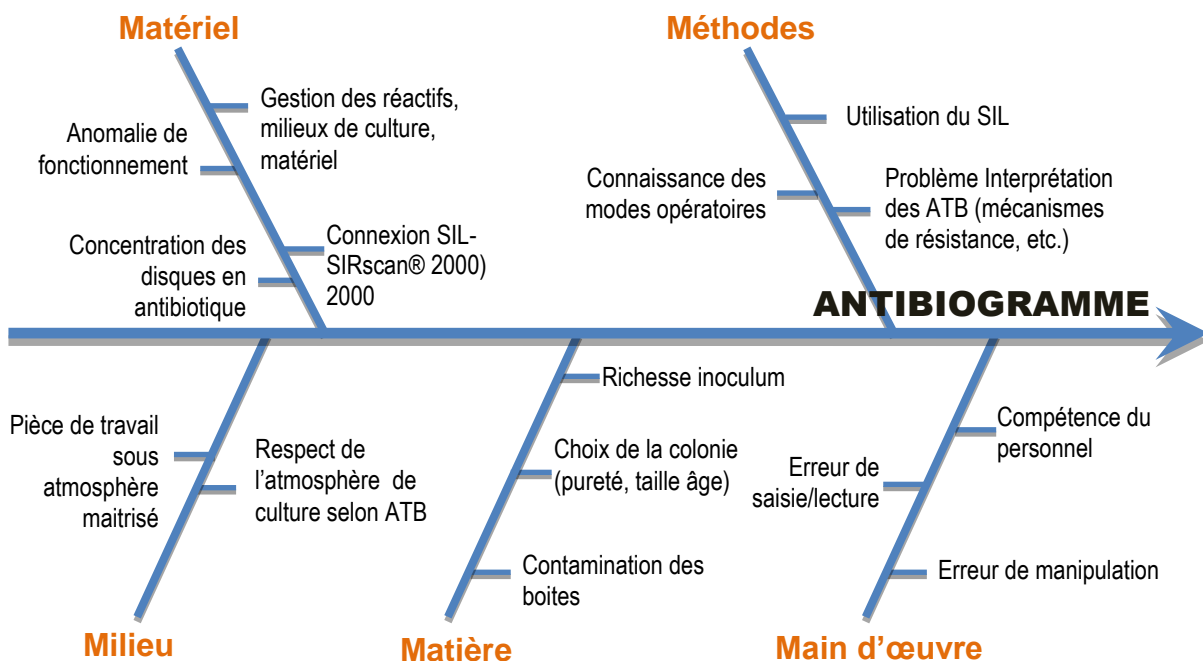


▪ Antibiogramme

Les Antibiogrammes (ATB) sont effectués en méthode manuelle selon la technique de diffusion en milieu solide. Les tests de CMI en bandelettes qui peuvent être faits en complément de l'antibiogramme utilisent la même méthode.

L'incubation et la lecture des antibiogrammes sont effectuées automatiquement par le SIRscan® 2000. Après cette première lecture automatique, le technicien contrôle et valide les diamètres lus et l'interprétation du SIRscan® 2000, puis le biologiste fait de même et apporte les corrections éventuelles.

Figure 6 : 5M de l'antibiogramme



4. ETUDE DE CRITICITÉ

4.2 Méthode AMDEC

L'évaluation de la criticité selon la méthode de l'AMDEC se fait en utilisant trois critères auxquels on applique une cote. Les trois critères sont les mêmes quel que soit le domaine d'étude concerné (fréquence, gravité, détectabilité) mais les valeurs de cotes peuvent changer. Nous avons décidé ici d'utiliser des valeurs de cotes allant de 1 à 3, de la même manière que celles présentées dans le SH GTA 06.

Pour la fréquence (F) d'apparition de l'anomalie :

1 correspond à une fréquence de 0 à 1 fois par an

2 à une fréquence de 2 à 3 fois par an

3 à une fréquence supérieure à 3 fois par an

Pour la gravité (G) de l'anomalie sur le processus analytique en prenant en compte son incidence sur le diagnostic, le traitement ou l'épidémiologie :

1 si l'anomalie n'a aucune incidence

2 si l'anomalie a une incidence probable

3 si l'anomalie a une incidence certaine

Pour la détectabilité de l'anomalie (D) :

1 si l'anomalie est détectable au cours du processus analytique

2 si l'anomalie peut être détectée au cours du processus analytique

3 si l'anomalie n'est pas détectable au cours du processus analytique.

Une fois la cotation de chaque facteur de risque attribuée, on va pouvoir établir un indice de criticité (IC) en multipliant les critères selon la formule : $IC = F \times G \times D$

Il appartient au laboratoire de définir à partir de quel seuil de criticité il souhaite mettre en place une action ou un CIQ selon son activité, ses objectifs de qualité, etc. Ici, comme dans l'exemple du COFRAC nous partons du principe qu'un indice de criticité supérieur à 6 nécessite la mise en place d'un CIQ.

Les dysfonctionnements présentant un indice de criticité inférieur ou égal à 6 doivent également être pris en compte, pour que l'ensemble du processus analytique soit maîtrisé.

Pour plus de lisibilité, l'étude de criticité a été séparée en deux tableaux (Tableau 1 et 2) distincts : « Réactifs » et « Processus analytiques ». Les tableaux font apparaître le risque incriminé, le calcul de l'indice de criticité, les actions à mener et finalement la nécessité ou non de mettre en place un CIQ pour ce risque.

Tableau 1 Evaluation de la criticité des réactifs en bactériologie

Réactifs (Milieux de cultures, réactifs automates, disques antibiotiques)						
Risque	F	G	D	I.C	Action à mener	CIQ
Vérification des documents qualités	1	3	1	3	Les fiches qualités sont obligatoires pour chaque réactif. Vérifier qu'elles sont mises à disposition par le fournisseur (sur internet en général)	non
Non-respect des délais et/ou conditions de transport	1	3	1	3	Vérifier à réception et comparer avec fiche de stress (disponible sur internet auprès du fournisseur).	non
Non-respect du délai et de la température de conservation au laboratoire	1	3	1	3	Maîtrise de la métrologie obligatoire. Destruction des produits	non
Anomalie sur un lot (réactovigilance)	1	3	2	6	Evaluer l'impact de l'incident et faire une enquête rétrospective. Suivi des lots fait pour les disques ATB, à étendre à tout le processus (l'APHP gère la réactovigilance)	non
Mauvais fonctionnement du couple automate / réactif	1	3	2	6	Contrôle du couple automate/réactif à un rythme adapté selon automate/analyse concerné (colorateur et spectromètre de masse ici)	non
Défaut de pousse d'un prélèvement connu non stérile (ex : expectoration, coproculture)	1	3	1	3	Vérification des milieux de culture, des procédures d'ensemencement	non

Tableau 2 Evaluation de la criticité du processus analytique en bactériologie

Processus analytiques							
5M	Risque	F	G	D	I.C	Action à mener	CIQ
Examen direct avant coloration / Examen microscopique après coloration							
Matériel	Microscope non fonctionnel	1	3	1	3	Contacter le fabricant. Contrôle annuel des microscopes selon contrat de maintenance	non
	Anomalie de coloration	2	2	2	8	Respecter les fréquences de maintenance recommandées. CIQ à mettre en place 1 fois par semaine et à chaque changement de lot.	OUI
Méthode	Variabilité liée aux techniques manuelles	2	3	2	12	Formation du personnel, respect des procédures. Corrélation inter-techniciens	OUI
	Connaissance des modes opératoires (coloration/lecture GRAM, MGG, cytologies)	1	3	1	3	Formation, habilitation	non
Matière	Pré-analytique défaillant	2	2	1	4	Respect des procédures et gestion des non conformités pour le pré-analytique. Indicateurs de contrôle à mettre en place (nombre de non conformités, délais d'acheminement des prélèvements, etc.)	non
	Qualité de prise en charge du prélèvement.	3	2	1	6	Informé / former le personnel	non
Milieu	Contamination du milieu ambiant	1	2	1	2	Travail sous PSM pour les prélèvements respiratoires (potentiellement contaminants) et les prélèvements précieux (ponctions et biopsies)	non
	T°C ambiante non maîtrisée	3	1	1	3	Métrologie des températures	non
Main d'œuvre	Compétence du personnel	1	3	2	6	Personnel formé et habilité pour les modes opératoires, selon la procédure d'habilitation	non
	Erreur de saisie/ lecture/ manipulation	1	3	1	3	- Personnel formé et habilité à l'utilisation du SIL et des feuilles de prélèvements. - Contrôles de saisie selon la procédure de vérification de l'intégration des informations avec mise en place de dossiers tests	non

5M	Risque	F	G	D	I.C	Action à mener	CIQ
Culture bactérienne							
Matériel	Maitrise de la métrologie des enceintes (étuves, chambre froide,...)	2	3	1	6	Cartographie, maintenance et métrologie des enceintes	non
Méthode	Défaut de détection d'hémocultures positives	2	3	3	12	Test de détection de positivité sur le BacT/alert® 3D avec une souche de référence	OUI
	Défaut de détection de bactéries anaérobies strictes ou microaérophiles	3	2	3	12	Test de détection avec 2 souches de référence, l'une en anaérobiose, l'autre en microaérophilie	OUI
	Connaissance des protocoles opératoires	1	3	1	3	Formation, habilitation du personnel	non
	Manque de reproductibilité des méthodes manuelles	2	2	1	4	Qualité de l'ensemencement, maitrisable avec la formation du personnel et le respect des procédures. Corrélation inter-techniciens.	non
Matière	Pré-analytique défaillant	2	2	1	4	Respect des procédures et gestion des non conformités pour le pré-analytique. Indicateurs de contrôle à mettre en place (nombre de non conformités, délais d'acheminement des prélèvements, etc.)	non
Milieu	Contamination du milieu ambiant	1	2	1	2	Travail sous PSM pour les prélèvements respiratoires (potentiellement contaminant) et les prélèvements importants (ponctions et biopsies)	non
Main d'œuvre	Compétence du personnel	1	3	2	6	Personnel formé et habilité selon la procédure d'habilitation	non
	Erreur de saisie / lecture	1	3	1	3	- Personnel formé et habilité à l'utilisation du SIL, et des feuilles de prélèvements. - Contrôles de saisie selon la procédure de vérification de l'intégration des informations avec mise en place de dossiers tests	non

5M	Risque	F	G	D	I.C	Action à mener	CIQ
Identification							
Matériel	Spectromètre non fonctionnel	1	3	2	6	Contacteur le fabricant. Entretien du spectromètre de masse MALDI-TOF par le fabricant selon le contrat	non
	Tests rapides d'orientation déficients	3	2	1	6	CIQ à mettre en place, fréquence à définir	non
	Méthode d'interprétation du logiciel Andromas (base de données)	1	3	2	6	- Contacter le fabricant qui met à jour et entretien le logiciel. - double lecture critique des résultats avec l'aide du profil de résistance de la bactérie (technicien/biologiste)	non
	Connexion automate-SIL	2	2	1	4	Contacteur le service support en charge de la gérance des connexions automates-SIL	non
Méthode	Erreur ou défaut d'identification du spectromètre de masse	2	3	2	12	Passage de souches de références à chaque plaque (déjà fait au quotidien), formalisation du CIQ Passage d'une hémoculture positive contenant une bactérie de culture difficile (cf culture bactérienne)	OUI
	Subjectivité de la lecture manuelle	2	3	1	6	-Formation/habilitation du personnel, connaissance des procédures - Double lecture technicien-biologiste	non
	Connaissance des modes opératoires	1	3	1	3	Habilitation et formation du personnel	non
	Utilisation du SIL	2	3	1	6	Formation à l'utilisation de Glms.	non

Matière	Manipulation de la colonie à identifier, préparation inoculum	1	3	2	6	Connaissance des procédures, formation et habilitation du personnel.	non
	Préparation de la plaque	2	2	1	4	Formation et habilitation à l'usage du spectromètre de masse	non
	Conservation des souches	1	1	2	2	Procédure de gestion de la conservation des souches isolées	non
Milieu	Température ambiante pièce du spectromètre de masse	1	2	1	2	L'automate, sensible à la température de la pièce, doit être placé en atmosphère climatisée avec surveillance des T°C	non
	Contamination du milieu ambiant	1	2	1	2	Contacteur prestataire responsable nettoyage, procédure de décontamination	non
Main d'œuvre	Erreur de saisie/ lecture/ manipulation	1	3	1	3	- Personnel formé et habilité à l'utilisation du SIL et des feuilles de prélèvements. - Contrôles de saisie selon la procédure de vérification de l'intégration des informations avec mise en place de dossiers tests	non
	Compétence du personnel	1	3	2	6	Personnel formé et habilité selon la procédure d'habilitation	non

5M	Risque	F	G	D	I.C	Action à mener	CIQ
Antibiogramme							
Matériel	Anomalies de fonctionnement du SIRscan® 2000 (ex:caméra défaillante)	1	3	1	3	- Paramétrage géré par le fabricant i2a lié au laboratoire par un contrat de maintenance. - Vérification de lecture manuellement par double lecture technicien/biologiste	non
	Connexion SIL-SIRscan® 2000	2	2	1	4	Contacteur le service support en charge de la gérance des connexions automates-SIL	non
	Concentration des disques et e-test (CMI) en antibiotique	2	3	2	12	Le CIQ en place au laboratoire permet de détecter une défaillance. Il est a coupler avec la vérification des documents qualités du fournisseur et le suivi des lots des disques.	OUI
Méthode	Utilisation du SIL	2	3	1	6	Formation à l'utilisation de Glims	non
	Problème d'interprétation des ATB (ex :βLSE non détectée)	2	3	1	6	Double lecture ATB. Paramétrage du système expert géré par le fabricant i2a lié au laboratoire par un contrat de maintenance.	non
	Connaissance des modes opératoires (réalisation ATB, conditions d'incubation, utilisation SIRscan® 2000)	2	2	1	4	Formation et habilitation du personnel, double lecture des boites de culture et des ATB.	non
Milieu	Respect de l'atmosphère de culture	1	3	1	3	- Connaissance des protocoles opératoires (quel ATB pour quel bactérie) - Entretien du SIRscan2000, métrologies des étuves.	non
	Atmosphère pièce de travail maîtrisé (température, hygiène)	1	2	1	2	Pièce climatisée : nécessité de tracer et d'analyser la température (maîtrise métrologique). Nettoyage quotidien des locaux par prestataire.	non
Matière	Choix de la colonie (pureté, taille, âge)	1	3	2	6	Connaissance des procédures, formation du personnel à la réalisation des antibiogrammes.	non
	Contamination	1	3	1	3	Respect des conditions d'hygiène et sécurité	non
	Richesse inoculum	2	3	1	6	Utilisation d'un densitomètre ou d'une gamme Mac Farland, formation et habilitation du personnel	non
Main d'œuvre	Erreur de saisie/lecture/manipulation	1	3	1	3	- Personnel formé et habilité à l'utilisation du SIL et des feuilles de prélèvements. - Contrôles de saisie selon la procédure de vérification de l'intégration des informations avec mise en place de dossiers tests	non
	Compétence du personnel	1	3	2	6	Personnel formé et habilité selon la procédure d'habilitation	non

5. ANALYSE DE L'ÉTUDE DE CRITICITÉ

5.2 Réactifs

Aucun item dans l'évaluation de la criticité des réactifs n'a fait apparaître la nécessité de mettre en place un CIQ. La maîtrise des risques inhérents aux réactifs va néanmoins nécessiter la mise en place de plusieurs actions au laboratoire :

- Etablir une procédure de gestion de stocks définissant les modalités de commandes, de réception et de stockage des réactifs. Cette procédure devra également définir les modalités de récupération des documents qualifiés (fiche de stress, fiche de conformité, etc.)¹.
- Définir les fournisseurs « critiques » dont les réactifs sont utilisés à une étape clef du diagnostic (ex : disques antibiotiques). La criticité des fournisseurs sera aussi évaluée en utilisant des indicateurs, comme le nombre de ruptures de stocks, le respect du délai de livraison, etc.
- Faire adopter par le pôle de Biologie de l'hôpital (qui gère la gestion documentaire des procédures communes du laboratoire) une procédure de veille scientifique, comprenant notamment la procédure de vérification de la réactovigilance (à l'APHP, elle est gérée par l'institution)

¹En pratique pour la vérification des documents qualifiés, tous les fournisseurs devraient mettre à disposition sur des sites internet dédiés les certificats de conformité et autres documents qualifiés concernant leurs réactifs. Il suffit ensuite de les télécharger à la demande. Par exemple, pour les réactifs achetés chez Biomérieux, le site www.mybiomérieux.com propose tous les documents nécessaires classés par numéro de lot, référence, etc. Un exemple de fiche de stress, de certificat de conformité et de certificat de contrôle de qualité est présenté en Annexe I, II et III.

5.3 Processus analytique

En reprenant le tableau 2, on note que sur les 47 risques répertoriés pour le processus analytique, 6 points apparaissent comme particulièrement critiques et nécessitent la mise en place d'un CIQ :

- *Examen direct avant et après coloration*
 - Les anomalies de colorations
 - La variabilité liée aux techniques manuelles

- *Culture bactérienne*
 - o Défaut de détection d'hémocultures positives
 - o Défaut de détection des bactéries anaérobies strictes ou micro-aérophiles
- *Identification*
 - o Les erreurs d'identification au spectromètre de masse (sur colonies et à partir de flacons d'hémocultures positives)
- *Antibiogramme*
 - o La concentration des disques en antibiotique

Nous constatons que ces points critiques sont répartis sur l'ensemble du processus analytique, ce qui montre bien l'importance d'un programme de CIQ plus complet que celui que nous réalisons jusqu'alors (antibiogrammes et CMI).

Outre ces 6 points nécessitant un CIQ, on peut s'apercevoir que sur les 41 autres facteurs de risque recensés, 20 concernent les aspects manuels du processus. La bactériologie étant une discipline encore très peu automatisée, cette analyse n'est pas surprenante mais montre la grande importance de la formation, de l'habilitation du personnel et de la bonne connaissance des modes opératoires du laboratoire. Cela montre aussi la complexité de mettre en place des CIQ dans un processus majoritairement manuel. La variabilité induite par les techniques manuelles est un risque présent sur une grande partie du processus mais il n'apparaît finalement critique que pour la partie examen direct avant et après coloration. Cela est dû au fait que le laboratoire maîtrise déjà cette variabilité sur certains points clefs, en effectuant une double lecture technicien/biologiste pour l'étape de choix des colonies à identifier et l'interprétation visuelle des antibiogrammes.

La mise en place d'un CIQ précis pour contrôler la variabilité des résultats liée aux techniques manuelle sur l'examen microscopique, paraît donc difficile, car dans ce champ rentrent toutes les techniques d'examen direct de prélèvements variés, avant et après coloration. Le CIQ ne peut plus alors être défini comme un contrôle de réactif ou de technique, mais se situe plutôt à mi-chemin entre les tests de reproductibilité inter-techniciens et l'habilitation du personnel.

Une autre étape nous paraît importante bien que non critique dans l'étude de criticité du processus analytique :

- Les tests rapides d'orientation (catalase, oxydase, test d'agglutination de *S. aureus* et de *S. pneumoniae* et, indole), ainsi que la céfinase (qui permet de rechercher la production de bêta-lactamase à partir d'une colonie).

Nous pensons qu'il est important de la maîtriser également à l'aide des matériaux de référence (MR).

6. MISE EN PLACE DES CIQ

6.1 Actuellement au laboratoire :

Cinq souches de référence sont testées mensuellement sur des antibiotiques définis selon les recommandations du CA-SFM. Il s'agit de

- *Escherichia coli* numéro Collection Institut Pasteur (CIP) 7624 équivalent du numéro American Type Culture Collection (ATCC) 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* CIP 76110 (ATCC 27853),
- *Staphylococcus aureus* CIP 7625 (ATCC 25923),
- *Providencia stuartii* CIP 107808,
- *Streptococcus pneumoniae* CIP104485

Le défaut de ces souches est qu'elles ne correspondent qu'à des espèces sauvages, sensibles aux antibiotiques.

6.2 CIQ à mettre en place

Le COFRAC dans le SH-GTA-06 insiste sur la nécessité de mettre en place des CIQ adaptés à la spécificité de l'activité du laboratoire (§11.9). De même, dans le même paragraphe il est précisé que la mise en place de CIQ avec des matériaux de référence (MR) doit tenir compte des recommandations des sociétés savantes. Il est donc nécessaire d'utiliser un panel de souches à tester le plus proche possible de l'activité du laboratoire. Il nous faut élargir le panel précédent en choisissant, pour les antibiogrammes, des bactéries présentant des profils de résistance retrouvés fréquemment au laboratoire comme les β -lactamases à spectre étendue (BLSE) ou les *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM), afin de contrôler la bonne interprétation délivrée par le système expert du SIRscan® 2000.

Ce nouveau panel de souches doit aussi être choisi de manière à pouvoir l'utiliser non seulement pour contrôler les antibiotiques, mais aussi pour mettre en place les CIQ pour les autres points critiques :

- Coloration de Gram
- Détection des hémocultures positives
- Détection des bactéries exigeantes nécessitant une atmosphère anaérobie ou micro-aérophile
- Identification par spectrométrie de masse (sur colonie et après extraction de bouillon d'hémoculture positives)

Les souches ont ainsi été choisies selon les recommandations 2013 de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (9) édité par l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Ce guide européen va devenir, courant 2014, le manuel de recommandations de référence pour la réalisation de l'antibiogramme en remplacement du CA-SFM. Sur l'éventail de souches qu'il propose, nous avons choisi d'en utiliser 10 :

- *Escherichia coli* ATCC 35218
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 46619 (Intermédiaire à la pénicilline)
- *Campylobacter jejuni* ATCC 33560
- *Klebsiella pneumoniae* CIP 700603 (qui est une β LSE)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 43866 (Qui est un SARM)
- *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 (résistant à la pénicilline)
- *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (résistant à la vancomycine)
- *Bacteroides fragilis* ATCC 25285

6.3 Plan d'action

6.3.1 CIQ sur l'examen direct avant et après coloration de Gram ou MGG

Il nous semble qu'il devrait être mis en place au moins à l'arrivée de nouveaux personnels et renouvelé une fois par an pour l'ensemble de l'équipe technique. En effet, la lourdeur de ce contrôle, puisqu'il concerne tous les techniciens de bactériologie, oblige à limiter leur fréquence.

Au cours de cette année nous avons décidé d'utiliser un CIQ commercialisé simulant des ponctions, permettant de compter et de reconnaître les différentes cellules sanguines (Cell-Chex de la société Streck) à différents niveaux de concentration et de déterminer la présence de cristaux. Ce contrôle est pour l'instant le seul CIQ commercial de ce type mais la qualité des cellules n'étant pas optimale, les résultats

sont difficilement exploitables. Sous réserve d'amélioration du matériel de contrôle, ce CIQ sera effectué une fois par an par l'ensemble de l'équipe technique.

En plus de ce CIQ, il est nécessaire de mettre en place au laboratoire une procédure d'habilitation du personnel plus complète que celle qui existe. En effet, nous n'avons jusque-là établi qu'une grille d'autoévaluation pour chaque technicien.

6.3.2 CIQ sur la culture

Les CIQ les plus pertinents pour contrôler la culture bactérienne sont les souches qui permettent, par leurs exigences de croissance, de vérifier les conditions de culture dans des atmosphères anaérobie et microaérophile (tableau 3).

Nous avons donc décidé de mettre en place un CIQ mensuel permettant de tester nos jarres d'anaérobiose avec une souche de référence de *B. fragilis* et nos sachets de microaérophilie avec la souche de référence de *C. jejuni*.

Nous allons également désormais vérifier la bonne détection des hémocultures positives en mettant en flacon d'hémoculture une fois par mois une des souches de référence. Ainsi 6 des 10 souches du panel seront à tour de rôle et selon cette fréquence mensuelle incubées dans le BacT/alert 3D. Nous noterons le temps après lequel une pousse est détectée (signal positif) et ces chiffres seront tracés pour comparaison avec les recommandations.

6.3.3 CIQ sur la coloration de Gram

Il nous semble nécessaire d'effectuer un contrôle de coloration avec un bacille à Gram négatif et un cocci à Gram positif. Nous avons jugé que ce contrôle devait être réalisé de la manière suivante :

Passage une fois par semaine et/ou à chaque changement de lot d'une lame témoin préparée à l'avance sur laquelle sont déposés deux spots correspondants aux souches d'*E. coli* et *S. aureus* de référence utilisées pour l'antibiogramme.

6.3.4 CIQ sur les tests d'orientations

Les CIQ doivent être réalisés à chaque changement de lot et/ou 1 fois par mois, en utilisant les souches de référence utilisées pour l'antibiogramme. La plupart des souches auront une utilité pour contrôler un de ces tests (tableau 3).

6.3.5 CIQ sur l'identification bactérienne

Pour l'identification par spectromètre de masse les pratiques actuelles sont satisfaisantes : passage de 3 souches de référence par plaque d'identification, soit 18 contrôles /jour. Nous allons seulement les adapter en utilisant les nouvelles souches de référence et en traçant les résultats au moyen d'un formulaire (tableau 3). Le CIQ ayant servi au contrôle de détection des hémocultures servira en parallèle au contrôle de l'identification par spectromètre de masse à partir d'un bouillon.

6.3.6 CIQ sur l'antibiogramme

9 souches seront désormais testées, toujours de manière mensuelle. Malgré le grand nombre d'antibiogrammes réalisés chaque jour au laboratoire, il ne nous semble pas nécessaire d'effectuer ce CIQ avec une fréquence plus élevée. En effet, ce contrôle a pour but de vérifier la qualité de la réalisation des antibiogrammes dans leur globalité, mais il est surtout un moyen important de vérifier l'un des points critiques de notre étude : la concentration des disques en antibiotique.

Ce point est particulièrement difficile à maîtriser étant donné le grand nombre d'antibiotiques en disques ou sous forme de bandelettes e-test (CMI) utilisés au laboratoire. A chaque antibiotique correspond un numéro de lot qui change selon une période aléatoire rendant les contrôles sinon impossibles, du moins très complexes (58 références de disques différentes et 49 CMI).

Nous avons donc procédé dans notre laboratoire à une réservation de lot auprès de notre fournisseur (Bio-rad), ce qui nous garantit un numéro de lot annuel et unique pour chaque antibiotique. Le lot ne changeant plus de manière aléatoire, il devient plus aisé d'effectuer le suivi des d'antibiotiques et ainsi il ne nous semble pas nécessaire d'effectuer le CIQ à une fréquence plus élevée.

Le Tableau 3 résume l'ensemble du programme de CIQ que nous avons choisi de mettre en place.

Tableau 3 Souches utilisées pour les CIQ

Souches de référence	Examen direct	Identification		Culture		Antibiogramme
	Coloration GRAM	Tests d'orientation	Spectromètre	Hémoculture	Atmosphère	Mécanisme de résistance
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	✓	Indole	✓	✓	NR	β lactamase
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NR ¹	Oxydase	✓	✓	NR	Souche sauvage
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	✓	Catalase, Céfinase, test d'agglutination latex	NR	✓	NR	Pénicillinase faiblement exprimée
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 46619	NR	Test d'agglutination Pneumokit	NR	✓	NR	Intermédiaire à la Penicilline
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560	NR	NR	NR	NR	Microaérophilie	Souche sauvage
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CIP 700603	NR	NR	NR	NR	NR	Productrice de βLSE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43866	NR	NR	NR	NR	NR	SARM
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247	NR	NR	NR	✓	NR	Résistant Pénicilline par PLP modifiées
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	NR	NR	✓	NR	NR	Résistance vancomycine
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	NR	NR	NR	✓	Anaérobiose	NR

¹NR : Non réalisé

CONCLUSION

La maîtrise du processus analytique en bactériologie est complexe pour plusieurs raisons. Le travail sur du vivant, d'une part, implique une variabilité rendant la standardisation difficile et d'autre part le résultat d'une analyse est bien souvent la conclusion de plusieurs étapes analytiques utilisant de nombreux réactifs. Si aujourd'hui les sociétés savantes et le COFRAC se sont intéressés au sujet et ont commencé à publier des recommandations, les réflexions sont toujours en cours afin d'harmoniser les pratiques.

A ce titre, l'étude de criticité paraît être le moyen le plus fiable pour un laboratoire de mettre en place un programme de CIQ complet permettant de maîtriser l'ensemble de sa phase analytique. Celle que nous avons menée ici nous a permis de balayer l'ensemble des risques inhérents au processus analytique et de les classer selon leur criticité. Ces résultats très enrichissants ont ensuite été analysés de manière critique pour cibler les CIQ à mettre en place. Cette analyse s'est faite après avoir défini nos tolérances et identifié les fréquences qui nous paraissaient les plus acceptables en termes d'objectif qualité et de faisabilité. En suivant cette démarche, nous avons mis en place un programme complet de CIQ pour notre laboratoire à partir de 10 souches de références.

Ce programme va être mis en place au laboratoire dans le courant du mois de Novembre 2014, lorsque la procédure de gestion des CIQ aura été complétée et que tous les formulaires nécessaires au bon déroulement des contrôles seront prêts à être utilisés. Cette procédure de gestion devra bien évidemment comprendre le détail du déroulement des contrôles (fréquence, procédure, etc.) mais aussi la conduite à tenir en cas de CIQ non conforme. Dès la mise en route complète du programme, il sera primordial de traiter les résultats obtenus au fur et à mesure afin de les restituer régulièrement à l'équipe. Par la suite, il sera possible de faire une analyse synthétique pour construire un indicateur de performance susceptible d'apporter la preuve de la pleine maîtrise des techniques utilisées au laboratoire. Un point sur les CIQ sera également présenté en revue de direction.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale
 2. Norme NF EN ISO 15189 : Aout 2007. « Laboratoires d'analyse de biologie médicale-exigences particulières concernant la qualité et la compétence. » AFNOR. www.afnor.org
 3. SH GTA 06. « contrôle de qualité en biologie médicale. » Révision 00, 06/2012, COFRAC, Section Santé Humaine.
 4. Recommandations 2011 – Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)
 5. SH REF 02. « Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale. » Révision 02, 02/2013. COFRAC, Section Santé Humaine.
 6. SH GTA 01. « Guide technique d'accréditation en biologie médicale. » Révision 00, 05/2011, COFRAC, Section Santé Humaine
 7. SH INF 50. « Portées-types d'accréditation. » Révision 00, 05/2011, COFRAC, Section Santé Humaine
 8. REMIC. Référentiel en Microbiologie médicale – 4^e édition 2010, REMIC, Société Française de Microbiologie
 9. EUCAST. « Détermination de la sensibilité aux antibiotiques ». Version 2.1, 02/2012, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), de l'European Society of Clinical Microbiology and infectious Diseases.
- Chevalier Benoît, « Analyse de risque en bactériologie dans le cadre de l'accréditation », (2011?) Biomnis.
- Chevalier Benoît, « Gestions des contrôles de qualité en bactériologie », (2011 ?) Biomnis.
- Comité Qualité (QUAMIC) « Reccomandations 2013 », Société Française de Microbiologie.
- Védý Serge, « Contrôle de qualité interne en antibiologie : retour d'expérience », Annales de Biologie Clinique, vol 70, n°3 mai-juin 2012, 341-352.
- Mémoire pour l'obtention du DU « Assurance qualité au laboratoire de biologie médicale » :
- Monrose Céline, « Formation et habilitation du personnel non médical en bactériologie », 2011-2012.
 - Verdet Charlotte, « Mise en place de contrôles de qualité interne dans un laboratoire de bactériologie », 2011-2012
 - Menuet Daria, « Mise en place du contrôle interne de qualité au laboratoire de Bactériologie », 2011-2012

ANNEXES

ANNEXE I	Exemple de certificat de conformité pour un milieu de culture	32
ANNEXE II	Exemple de fiche de stress pour un milieu de culture commercialisé	33
ANNEXE III	Exemple de certificat de contrôle qualité pour un lot de milieux de cultures commercialisés	34

ANNEXE I :

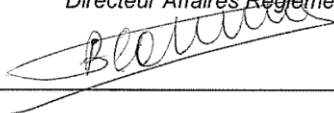
Exemple de certificat de conformité pour un milieu de culture commercial
(Gélose Columbia additionnée de 5% de sang de mouton, distribuée par Bio Mérieux)

DEC/43041	 BIOMÉRIEUX	Révision : 1	Page : 1/1
------------------	---	--------------	------------

DECLARATION OF CONFORMITY / DECLARATION DE CONFORMITE

Validity declaration of conformity from date / Date de déclaration de conformité :
Place / Lieu d'émission : Craponne - France
Date of the issue of the declaration of conformity /
Date d'application de la déclaration de conformité : - 1 OCT 2004

Product identification / Identification du produit :
Name / Nom : Columbia agar + 5 % sheep blood /
Gélose Columbia + 5 % de sang de mouton
(COS)
Ref. 43 041
2 x 10 plates / boîtes (90 mm)
Ref. 43 049
10 x 10 plates / boîtes (90 mm)

Identification of the person who has the power of attorney to bind the manufacturer to this declaration / Identification du signataire représentant le fabricant :
Name / Nom : FLEURY Bernard
Authority / Fonction : Regulatory Affairs Director /
Directeur Affaires Réglementaires
Signature : 

Identification of the legal entity / Identification de l'entité légale :
Manufacturer / Fabricant :
Name / Nom : BIOMÉRIEUX SA
Address / Adresse : Chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Etoile - FRANCE

« We, the manufacturer hereby declare that the above mentioned products comply with the Directives and their relevant implementations into all national laws of the member states into which we place the products » / « Nous, fabricant, déclarons que les produits mentionnés ci-dessus satisfont aux Directives et leurs transpositions en droit national dans les Etats Membres dans lesquels les produits sont mis sur le marché. »

Conformity assessment procedure used to demonstrate compliance / Procédure d'évaluation de conformité choisie :
Annex III (section 6 excluded) / Annexe III (section 6 exclue)
Directive (s) : 98/79/CE

ANNEXE II :

Exemple de fiche de stress pour un milieu de culture commercial
(Gélose Columbia additionnée de 5% de sang de mouton, distribuée par Bio Mérieux)



STABILITY STUDY : THERMAL SHOCK VALIDATION

Product : Columbia agar + 5% sheep blood

Reference : 43041: 2x10 plates

43049: 10x10 plates

Introduction:

The stability of Columbia agar + 5% sheep blood, reference 43041 and 43049, have been verified by performing real time stability study including thermal shocks sequence to simulate delivery process.

Protocol:

This study is carried out according to the EN 13640 "Stability testing of in vitro diagnostic reagent" recommendations. The storage temperature of Columbia agar + 5% sheep blood is 2-8°C. The thermal shocks out of temperature specification to which the product has been submitted includes a passage of 136 hours at 18-25°C and 8 hours at 35-39°C. This study supports product performance during shelf life.

Summary of the stability study protocol:

The trials that have been performed consist of verifying conformity of appearance, fertility and pH.

Several points have been tested during the stability study:

T₀ = initial point



T_i = middle point

T_x and T_{x+1} (T_x corresponding to the shelf-life)

The performances are maintained until expiration date.

Observations: A thermal shock at 35-39°C may generate a blood brunishment or auto-hemolysis

Do not use hemolysed plates.

Author : V.HEINRICH QA Support	Approver : F.VILLEVAL Developpement manager
Date / Signature March 2007 	Date / Signature March 2007 

ANNEXE III :

Exemple de certificat de contrôle qualité pour un lot de milieux de culture commercialisés
(Gélose Columbia additionnée de 5% de sang de mouton, distribuée par Bio Mérieux)

Certificat de Contrôle Qualité Quality Control Certificate

43041 **Gélose Columbia + 5% sang de mouton /**
Columbia agar + 5% sheep blood

Lot de Conditionnement / *Packaging Lot* : 1002584900
Date d'expiration / *Expiration date* : 2013-11-14

Revision : 9

Milieu en boîte de Pétri / <i>pre-plated medium</i> 20 boîtes / 20 dishes	Résultats / Results	Théorie / <i>Theoretical results</i>
Aspect / <i>Appearance</i>	CONFORME	Conformité / Spécifications <i>Conformity / Specifications</i>
Couleur / <i>Colour</i>	CONFORME	Gélose rouge sang / <i>Blood-red agar</i>
pH / <i>pH</i>	7.2	7.3 +/- 0.3
Activité bactériologique / <i>Bacteriological activity</i>		Incubation à 33-37°C / <i>Incubation at 33-37°C</i>
- Bacteroides fragilis ATCC 25285	CONFORME	Bonne croissance en 48 heures / <i>Good growth in 48 hours</i>
- Streptococcus pyogenes ATCC 19615 - Streptococcus pneumoniae ATCC 6305 - Listeria monocytogenes ATCC 35152 - Staphylococcus aureus ATCC 25923 - Escherichia coli ATCC 25922	CONFORME	Bonne croissance en 24 heures / <i>Good growth in 24 hours</i> Réaction hémolytique caractéristique / <i>Characteristic hemolytic reaction</i>
Etat microbiologique / <i>Microbiological state</i> 4 jours à 20-25°C et 33-37°C / <i>4 days at 20-25°C and 33-37°C</i>	CONFORME	Conformité / Spécifications <i>Conformity / Specifications</i>
Marquage au jet d'encre / <i>Ink jet printing</i> Contrôle en ligne / <i>In process control</i>	CONFORME	Numéro de lot / <i>Lot number</i> Date d'expiration / <i>Expiration date</i>
Etiquetage / <i>Labelling</i> Contrôle en ligne / <i>In process control</i>	CONFORME	Conformité / Spécifications <i>Conformity / Specifications</i>

Lot accepté le / *Accepted on* : 11/09/2013

Par / *By* : Nathan BASSET
Département Qualité /
Quality Department - CRAPONNE.

Ce document a été libéré électroniquement (Fin du document) / *This document has been released electronically (End of document)*



RÉSUMÉ

Le laboratoire de Bactériologie de l'hôpital Necker-Enfants Malades est entré dans la démarche d'accréditation selon la Norme ISO EN NF 15189 dès 2009 avec l'ensemble du pôle Biologie Produits de santé en créant une Cellule Qualité. Le dossier d'accréditation initiale a été déposé et la Bactériologie devrait être auditée courant 2015.

La mise en place de Contrôles Interne de Qualité (CIQ) est une obligation visant à vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue. Nous avons déjà mis en place un CIQ sur la réalisation des antibiogrammes mais il est nécessaire de maîtriser l'ensemble du processus analytique. Nous avons donc décidé d'élargir ce programme afin de mettre en place les CIQ les plus efficaces et adaptés à l'activité du laboratoire. Nous avons choisi de suivre la méthodologie décrite par le COFRAC dans le guide technique d'accréditation SH GTA 06, en se basant sur une étude de criticité de l'ensemble du processus analytique pour cibler les CIQ sur les points critiques.

Après avoir recensé l'ensemble des réactifs et processus du laboratoire, nous avons établis les facteurs de risques pour chacun de ces items et les avons regroupés sous formes de diagrammes des 5M. Ces diagrammes nous ont ensuite servi à construire l'étude de criticité selon la méthode AMDEC qui consiste à calculer un indice de criticité pour chaque facteur de risque en fonction de 3 critères (fréquence, gravité, détectabilité). 53 facteurs de risques sont ainsi ressortis au total dont 6 critiques.

L'analyse de ces résultats nous a amené à revoir notre panel de souches de référence afin qu'il soit plus large et plus proche de la réalité quotidienne du laboratoire. Un nouveau programme de CIQ a donc été mis en place aux points critiques du processus. L'étude de criticité nous a aussi montré l'importance de maîtriser totalement le processus, y compris sur les facteurs de risque non critiques. L'aspect manuel de la bactériologie est également ressorti, compliquant ainsi la mise en place de certains CIQ (l'examen direct par exemple). L'habilitation du personnel apparait donc comme un point clef de la maîtrise du processus analytique.

Ce programme de CIQ devrait être mis en route en Novembre 2014 et ses résultats devront être suivis, analysés et présentés afin d'en faire un axe d'amélioration continue de la qualité au laboratoire.