

Université Pierre et Marie Curie

Paris 6

MEMOIRE
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE
DE BIOLOGIE MEDICALE »

ACCREDITATION EN BACTERIOLOGIE :

VERIFICATION D'UNE METHODE
D'ENSEMENCEMENT AUTOMATISE DES
ECHANTILLONS:MISE EN PLACE DU PRELUD®

BATTAGLINI Vanessa

2013-2014

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 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.



BATTAGLINI Vanessa

Technicienne de laboratoire

Service de Microbiologie
Centre Hospitalier René Dubos
6 avenue de l'Île de France
95300 Pontoise

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont soutenue pendant cette année et qui ont rendu possible ce travail.

Un grand merci à Pascale Martres, Praticien Hospitalier Chef de service, Responsable Assurance Qualité du Service de Microbiologie, pour sa disponibilité en ces temps difficiles et pour ses précieux conseils.

Je remercie vivement Laurence Chauvin-Baron, cadre de santé du Service de Microbiologie pour ses conseils,

Merci aux responsables et intervenants du DU « Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale » pour la formation dispensée.

Je remercie l'ensemble du Service de Microbiologie et surtout Hélène Lemêle, Victoria Chea pour leur aide précieuse, sans oublier Benoist Feugueur pour la partie informatique et Anthony Launay pour la partie métrologie,

Merci à ma famille et mes amies qui m'ont soutenue et encouragée.

GLOSSAIRE

AGP	:	Absence de Germe Pathogène
AGPCJ	:	Absence de Germe Pathogène Ce Jour
ATBg	:	Antibiogramme
BIAS	:	Biologie, Imagerie, Activités Médicales Transversales, Santé Publique
CHIPO	:	Centre Hospitalier Intercommunal des Portes de l'Oise
CHOC	:	Chocolate Agar + PolyVitex (PVX)
CHRD	:	Centre Hospitalier René Dubos
CIP	:	Collection de l'Institut Pasteur
CIQ	:	Contrôle Interne de Qualité
COFRAC	:	Comité Français d'Accréditation
COS	:	Columbia Agar + 5% de sheep blood
CPS	:	ChromID, Gélose Chromogène
DBM	:	Département de Biologie Médicale
DBU	:	Dénombrement Bactérien Urinaire
ECBU	:	Examen Cyto-Bactériologique Urinaire
EHPAD	:	Etablissement d'Hébergement pour Personnes Agées Dépendantes
EMT	:	Ecart Majeur Toléré
ETP	:	Equivalent temps plein
FPNE	:	Flore polymorphe Non Etudiée
GBS	:	Gélose Brilliance GBS (dépistage des <i>streptococcus</i> du groupe B)
GCSBM	:	Groupement de Coordination Sanitaire de Biologie Médicale
LBM	:	Laboratoire de Biologie Médicale
MCO	:	Médecine Chirurgie Obstétrique
NC	:	Non-Conformité

PH	:	Praticien Hospitalier
PSM	:	Poste de Sécurité Microbiologique
PV	:	Prélèvement vaginal
QUAMIC	:	Comité Qualité de la Société Française de Microbiologie
RAQ	:	Responsable Assurance Qualité
REMIC	:	Référentiel en Microbiologie Médicale
SIL	:	Système Informatique du Laboratoire
SSR	:	Soins de Suite et de Réadaptation
UFC	:	Unité Formant Colonie
VCN	:	Chocolate Agar + PolyVitex VCAT3 (VCA ₃)

SOMMAIRE

1	Introduction	1
2	Présentation de l'étude	2
2.1	Présentation de la structure	2
2.2	Présentation de la politique de qualité du service.....	3
2.3	Objectif de l'étude.....	4
3	Méthodologie de mise en œuvre : 5M	5
3.1	Maîtrise de la Matière.....	6
3.2	Maîtrise du milieu : Métrologie	7
3.3	Maîtrise du Matériel	7
3.4	Maîtrise de la Main-d'œuvre	8
3.5	Maîtrise de la Méthode.....	8
4	RESULTATS	12
4.1	Maîtrise de la Matière.....	12
4.2	Maîtrise du milieu	13
4.3	Maîtrise du matériel.....	14
4.4	Maîtrise de la Main-d'œuvre	15
4.5	Maîtrise de la Méthode.....	16
4.5.1	Suivi du CIQ et de la non-contamination bactérienne	16
4.5.2	Evaluation de la Reproductibilité	18
4.5.3	Evaluation de la contamination bactérienne	21
4.5.4	Evaluation du dénombrement bactérien (DB)	23
4.5.5	Comparaison de méthodes	24
5	CONCLUSION.....	28
6	BIBLIOGRAPHIE	29
7	ANNEXES	30
	Annexe I : Organigramme GCS Biologie Medicales Nord Val d'Oise	31
	Annexe II : ORGANIGRAMME LBM PONTOISE	32
	Annexe III : Formaliser l'ensemencement manuel grâce au Prelud.....	33
	Annexe IV : Définition des EMT.....	34
	Annexe V : Abaque dénombrement bactérien fournie par I2A	35
	Annexe VI : Extrait du protocole de validation du PRELUD® fournit par I2A	36
	Annexe VII : Questionnaire.....	38
	Annexe VIII : Tableau de traçabilité des maintenances.....	43

1 INTRODUCTION

La ratification de l'ordonnance du 13 janvier 2010 rend obligatoire l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 pour les laboratoires de Biologie Médicale ^(1;2). A compter du 01/11/2016 les LBM ne pourront plus fonctionner sans disposer d'une accréditation portant sur 50% des examens de Biologie Médicale qu'ils réalisent, sur 70% en 2018, et sur la totalité de leur activité, soit 100%, en 2020.

Le Service de Microbiologie du CHRD fait partie du DBM du CHRD qui lui-même fait partie du Groupement de Coopération Sanitaire de Biologie Médicale Nord Val d'Oise (GCSBM). Le GCSBM a été créé en 2012 et est composé du DBM du CHRD de Pontoise et du LBM du Centre Hospitalier Intercommunal des Portes de l'Oise de Beaumont/Oise. En 2015, les prélèvements de Microbiologie du CHIPO, hormis les examens définis comme urgents, seront pris en charge sur le site de Pontoise par le Service de Microbiologie du CHRD. L'audit COFRAC initial du GCSBM a eu lieu Février 2014 et a concerné 39 paramètres de la famille Biochimie.

L'accréditation en bactériologie reste compliquée et est moins avancée que d'autres disciplines comme l'Hématologie et la Biochimie car les techniques sont majoritairement manuelles et plus difficilement standardisables. Afin de permettre la standardisation des techniques, le suivi des numéros de lots des milieux de culture, la traçabilité du parcours des échantillons, l'absorption d'activité du Service de Microbiologie (+25% entre 2009 et 2013) et l'arrivée sur le site du CHRD des prélèvements du site du CHIPO en 2015, le Service de Microbiologie a acquis en janvier 2014 un ensemencement automatisé récemment mis sur le marché, le Prélud®, fourni par I2a.

L'ensemencement des ECBU et des PV par le Prélud® est la première étape de la mise en place cet automate dans le service de Microbiologie. Selon le QUAMIC⁽³⁾, ces méthodes sont qualitatives, même si le résultat de l'ECBU comprend un dénombrement bactérien.

L'objectif de cette étude est de constituer un dossier de vérification de méthode concernant deux types d'échantillons (PV et ECBU), suivant les recommandations du COFRAC et en tenant compte des recommandations du fournisseur.

L'utilisation du formulaire SH FORM 44 est un guide permettant de réaliser cette vérification de méthode. Cette dernière entre dans les critères d'une portée d'accréditation de type A (méthode reconnue et proposée par le fournisseur) assurant que les performances sont atteintes dans les conditions de routine.

Ce dossier comporte l'étude de la reproductibilité des ensemencements, l'évaluation de la contamination bactérienne inter-échantillons, l'évaluation du dénombrement bactérien et la comparaison des deux méthodes d'ensemencement, manuelle et automatisée.

Une analyse des risques est réalisée selon la méthode des 5M, c'est à dire ceux associés à la Matière, au Matériel, au Milieu, à la Main d'œuvre et à la Méthode.

2 PRESENTATION DE L'ETUDE

2.1 PRESENTATION DE LA STRUCTURE

Le service de Microbiologie fait partie du DBM qui lui-même est intégré au pôle B.I.A.S au sein du CHRD de Pontoise. L'activité du CHRD est répartie en huit pôles : trois pôles Médecine, un pôle Chirurgie, un pôle Femme-Enfant, un pôle Cœur-vaisseau, un pôle Psychiatrie et un pôle B.I.A.S. La capacité d'accueil du CHRD est de 1153 lits et places, toutes spécialités confondues. En 2013, il a réalisé 70 917 séjours en MCO, 170 862 journées d'hospitalisation SSR, EHPAD et Psychiatrie, 110 778 passages aux différentes urgences et 4895 accouchements. L'activité de Biologie réalisée par les Services de Microbiologie et de Biochimie est de 28 032 919 B et 1 634 552 BHN (environ 10 millions de B+BHN pour la Microbiologie).

Le service de Microbiologie regroupe plusieurs spécialités biologiques, la Bactériologie la Parasitologie, la Mycologie, la Virologie, la Sérologie infectieuse et la Biologie Moléculaire infectieuse.

Le service de Microbiologie est ouvert 7 jours sur 7, 24H/24, il réalise les examens des patients hospitalisés au CHRD, certains examens du CHIPO et ceux prescrits en consultations externes ou par tout autre médecin. Un accueil de ces patients externes est organisé au sein du DBM pour effectuer les prélèvements. Pour les horaires de garde, une liste limitative des examens effectués a été élaborée. A partir de 21H30, ce sont des techniciens habilités du Service de Biochimie qui effectuent les examens recensés sur la liste limitative. Les ECBU et les PV ne faisant pas partie de cette liste, sont conservés à température ambiante dans le Service de Microbiologie jusqu'à ensemencement.

Le personnel est composé de 17 techniciens (soit 16,6 ETP), un cadre et 3 Praticiens Hospitaliers. Le secrétariat, chargé de l'accueil des prélèvements, est commun aux 2 services (Biochimie et Bactériologie) et est composé de 6 secrétaires et agents d'accueil.

Les PH Microbiologistes sont polyvalents dans toutes les spécialités de la Microbiologie prises en charge dans le Service.

Les techniciens sont polyvalents en Microbiologie mais seulement quatre sont habilités en Biologie Moléculaire Infectieuse.

2.2 PRESENTATION DE LA POLITIQUE DE QUALITE DU SERVICE

Depuis plusieurs années, le service de Microbiologie est entré dans une Démarche Qualité engagée, en collaboration avec les membres du Département de Biologie Médicale et du CHIPO dans le cadre du GCSBM. Le RAQ du service de Microbiologie a animé la Cellule Transversale Assurance Qualité du pôle de 2009 à 2012, a participé activement à la rédaction du Manuel Qualité du GCSBM, au manuel des prélèvements et au répertoire des examens de Microbiologie du DBM et au déploiement du logiciel de qualité du GCSBM. Depuis 2012, un RAQ et une Cellule Qualité sont identifiés pour le GCSBM, ainsi que des RAQ et Techniciens référents qualité pour chaque spécialité (Biochimie, Microbiologie) et sur chaque site (Pontoise, Beaumont). Les organigrammes fournis en annexe I et II, détaillent ces points.

Enfin, le GCSBM et donc le service de Microbiologie, bénéficient depuis 2011 de l'accompagnement par la société Alain Cœur Conseil, afin de mener à bien la procédure d'accréditation.

L'accréditation en bactériologie est plus difficile à mettre en œuvre que pour d'autres disciplines, en effet les bactéries sont vivantes et potentiellement virulentes, l'automatisation (donc la standardisation) est récente et l'analyse bactériologique s'effectue sur plusieurs jours, de J=0 à J=3 voire plus, ce qui complexifie le processus. C'est pourquoi aucun examen du service de Microbiologie n'est accrédité à ce jour.

La Politique Qualité de l'année 2014 du service de Microbiologie porte sur les vérifications de méthodes des automates récemment acquis, le Prelud® (qui nous concerne ici) et l'Urised® (automate de cytologie urinaire fourni par la société I2a), dans le cadre de leur mise en place.

2.3 OBJECTIF DE L'ETUDE

L'objectif est de constituer un dossier de vérification de méthode d'ensemencement des ECBU et PV à l'aide du Prelud® suivant la norme NF EN ISO 15189. Il permettra de mettre en application l'enseignement reçu cette année.

Dans un premier temps, nous utiliserons la méthode des 5M pour réaliser l'analyse des risques énoncés dans le formulaire SH FORM 44 du COFRAC, avec les différents points à maîtriser pour l'utilisation du Prelud®.

Puis dans un second temps, nous utiliserons le protocole de validation proposé par le fournisseur, qui a été adapté par le service⁽⁵⁾.

Le Prelud® effectue l'ensemencement automatisé d'échantillons biologiques liquides en tube stériles ou d'échantillons prélevés sur écouvillons secs ou écouvillons en milieu de transport. Huit types de milieux différents dont les numéros de lots sont tracés peuvent être chargés dans les carafes d'entrée. Les écouvillons ou tubes, disposés sur un portoir spécifique, sont acheminés via un convoyeur jusqu'à un lecteur de code-barres. Ce code-barres, issu du SIL lors de l'enregistrement du prélèvement, renseigne sur la nature de l'échantillon, l'identité du patient et la méthode d'ensemencement à mettre en œuvre. La pince « échantillon » du Prelud® saisit le tube ou l'écouvillon par le bouchon, le place dans un vortex afin d'homogénéiser l'échantillon, et débouche le tube. L'ensemencement s'effectue dans le Prelud® dans un environnement protégé type PSM selon le schéma programmé et les différents outils. Trois oèses calibrées de 10µL, trois boules de Trigalski et des cônes stériles à usage unique sont à disposition pour effectuer les ensemencements et isollements. Les oèses et les boules de Trigalski sont utilisées à tour de rôle et stérilisées à 400°C dans le four du Prelud® après chaque utilisation. Les schémas d'ensemencement définis par le PH Microbiologiste référent du Prelud® (qui est aussi le RAQ du service) et programmés par l'ingénieur d'application de la société I2a figurent en annexe III. Après ensemencement, la pince rebouche le tube et le repose sur le portoir. L'imprimante du Prelud® identifie chaque boîte ensemencée en appliquant sur la tranche et le couvercle un code-barres, le nom du patient, le numéro du dossier, le type de prélèvement, le service d'hospitalisation, la date et l'heure d'ensemencement. Les boîtes ensemencées sont réparties dans les huit carafes de sorties en fonction de l'atmosphère dans laquelle elles vont être incubées et/ou du type de milieu ensemencé.

Le service de Microbiologie prend en charge 13 000 ECBU/an pour le diagnostic d'infection urinaire et dans le cadre des bilans pré opératoires. Il reçoit aussi 3 800 PV /an pour la mise en évidence de bactéries responsable d'infections génitales mais aussi pour la recherche

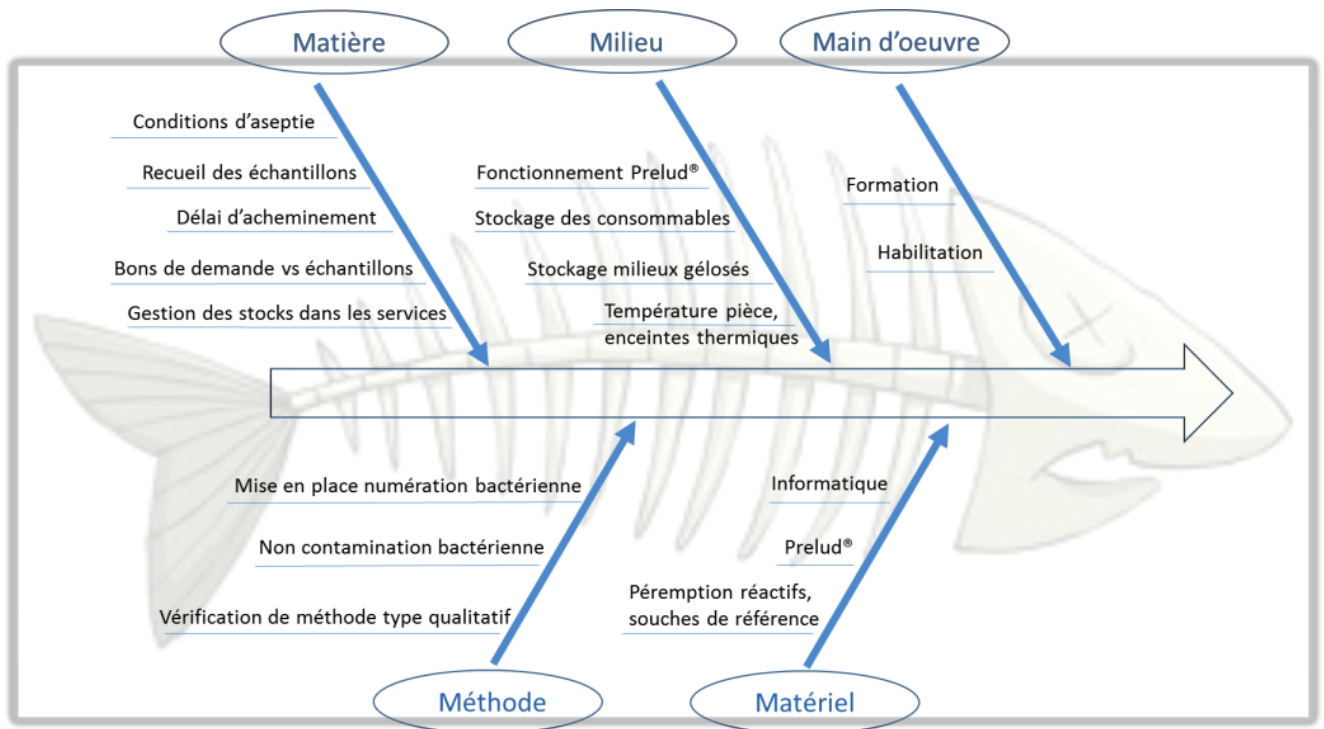
systematique de *Streptococcus agalactiae* (groupe B) et/ou d'*Escherichia coli* K1 chez les femmes enceintes.

3 METHODOLOGIE DE MISE EN ŒUVRE : 5M

Lors de la mise en place du Prelud® dans le service et avant toute vérification de méthode, une analyse des risques a été effectuée en utilisant la méthodologie d'Ishikawa ou méthode des 5 M. Celle-ci nous permet de représenter l'ensemble des risques à maîtriser (Matière, Matériel, Milieu, Main d'œuvre et Méthode) afin de travailler selon les recommandations du COFRAC.

Le diagramme d'Ishikawa va nous permettre d'identifier les causes possibles d'un problème ou défaut et d'agir sur celles-ci et de les anticiper.

Le diagramme ci-dessous montre les points critiques à maîtriser que nous avons identifiés ; ces points sont repris dans les paragraphes qui suivent.



Grphe 1 : Diagramme d'Ishikawa représentant les 5M des points à maîtriser

3.1 MAITRISE DE LA MATIERE

Cinq points critiques ont été identifiés afin de maîtriser ces données.

Le premier est de respecter les conditions d'aseptie au moment du prélèvement, les règles d'hygiène (friction hydro-alcoolique des mains, port de gants...) doivent être respectées et sont décrites dans le manuel de prélèvement du DBM, disponible sur le site intranet de l'établissement.

Le second est de respecter les conditions de recueil préconisées des différents échantillons, afin de limiter le nombre d'urines contaminées par la flore génitale ou du prépuce. Ces urines contaminées montrent en culture 3 types de germes ou plus, on parle alors de flore polymorphe. Les urines sont recueillies dans des tubes stériles sous vide de 10 mL contenant de l'acide borique La multiplication des germes est ainsi stoppée par l'acide borique et le nombre d'UFC obtenu après incubation du milieu ensemencé est le reflet de la concentration bactérienne vésicale. Les conditions de recueil de prélèvements sont décrites dans le manuel de prélèvement, disponible sur l'intranet de l'hôpital. Toutefois, il faut réaliser une toilette uro-génitale avec un savon doux ou avec un antiseptique uro-génital à usage unique. Le premier jet d'urine doit être éliminé dans les toilettes, le tube boraté rempli par un système de vacutainer avec le 2^{ème} jet. Pour les patients externes, une explication orale est donnée sur les modalités de prélèvement. Une compresse à usage unique imbibée d'antiseptique est fournie au patient.

Les PV sont effectués à l'aide d'écouvillons stériles destinés à être déchargés en milieux de transport liquide : les Transwab® sont utilisés dans notre établissement. La tige de ces écouvillons est sécable et permet le rebouchage du tube, la tige s'introduisant dans une coche spéciale à l'intérieur du bouchon lors du rebouchage, permettant de manipuler de manière aseptique l'écouvillon lors de l'ensemencement. Les Transwab® permettent une meilleure conservation des bactéries aérobies, anaérobies et fastidieuses (jusqu'à 48H après le prélèvement). L'utilisation de ces écouvillons a été limitée aux 6 services d'hospitalisation et d'urgences de Gynécologie/Obstétrique du CHR. Le PH Microbiologiste référent du Prélud® s'est rendu dans les services afin d'expliquer les modalités de prélèvements et donner une fiche explicative. Les services de Gynécologie/Obstétrique urgences maternité présentant beaucoup de personnels (4895 accouchements/an), la difficulté rencontrée a été d'informer la totalité de ceux-ci.

Le troisième point est la maîtrise du délai d'acheminement. Selon, le répertoire des examens de Microbiologie, celui-ci ne doit pas dépasser 2 heures à température ambiante pour tous les prélèvements bactériologiques (recommandations du REMIC⁽⁹⁾), y compris les ECBU et les PV. Néanmoins, l'utilisation de milieux de transport pour les PV et l'utilisation de borate

pour les ECBU permet de conserver plus longtemps les échantillons sans altérer la viabilité des germes et de suivre les recommandations des fournisseurs qui sont de ne pas dépasser 48 heures à température ambiante. C'est par souci d'homogénéité que le délai mentionné est de 2H pour tous les prélèvements bactériologiques hors prélèvements urgents, y compris échantillons prélevés sur milieux de transport. Pour les ECBU et PV prélevés au laboratoire d'externes, situé même au niveau, il n'y a pas de problèmes de délai de transport.

Le quatrième point est la concordance entre la feuille de prescription et l'échantillon, en termes d'identité du patient et de nature de prélèvement. C'est une étape primordiale. Tout échantillon ne satisfaisant pas à ces critères fait l'objet d'une non-conformité (NC), qui est enregistrée dans le SIL. Certaines NC aboutissent à l'annulation du prélèvement, car sauf circonstance exceptionnelle, les PV et ECBU ne sont pas des prélèvements « précieux ».

Le cinquième point repose sur la gestion des stocks et des dates de péremption des matériels dans les services. Des référents ont été nommés et sont en charge de gérer les stocks. Ce sont eux qui passent les commandes au DBM pour approvisionner leurs stocks.

3.2 MAITRISE DU MILIEU : METROLOGIE

La maîtrise du milieu passe par la maîtrise métrologique des locaux, température de la pièce, des enceintes thermiques et des réfrigérateurs. Cela implique de connaître les conditions de fonctionnement de l'automate, les conditions de stockage des milieux de culture à température ambiante et réfrigéré et des consommables donc de définir les EMT de la pièce (Annexe IV).

3.3 MAITRISE DU MATERIEL

L'utilisation du Prelud[®] nécessite de maîtriser son fonctionnement, de réaliser les maintenances régulières prévues au calendrier, de connaître le SIL et de gérer les pannes.

L'utilisation des milieux gélosés, de Transwab[®] et de tubes boratés nécessite la vérification des dates de péremption avant tout chargement et ensemencement et la présence des certificats de conformité et de stress lors de la réception des commandes.

Le délai de croissance et les caractéristiques des souches de référence utilisées pour évaluer la contamination inter-échantillon et le dénombrement bactérien urinaire (DBU) doivent être maîtrisés.

3.4 MAITRISE DE LA MAIN-D'ŒUVRE

➤ Formation

Lors de la mise en place du Prelud[®], le fournisseur a effectué la formation des 4 techniciens référents, des 3 PH Microbiologistes, du cadre de santé ainsi que du personnel technique présent. La rédaction de la procédure de l'utilisation du Prelud[®] en routine a été rédigée, validée et diffusée. Lorsque la vérification de méthode a été finalisée, et avant l'utilisation en routine du Prelud[®] pour les PV et ECBU, une nouvelle formation a été délivrée à tout le personnel technique par le fournisseur puis de nouveau par les techniciens référents.

Lors des réunions hebdomadaires, le personnel technique est informé de l'avancement du projet du Prelud[®].

➤ Habilitation

L'utilisation du Prelud[®] fait partie du poste de travail d'ensemencement des différents échantillons biologiques pris en charge par le service de Microbiologie. Il ne remplace qu'une partie des ensemencements réalisés manuellement. Le personnel technique doit maîtriser les différentes tâches décrites à ce poste de travail pour être habilité par le Microbiologiste.

3.5 MAITRISE DE LA METHODE

➤ Mise en place d'un CIQ

A l'heure actuelle, il n'existe pas de CIQ conçu pour un automate tel que le Prelud[®], ni de CIQ conseillé par le fournisseur. Toutefois, nous avons décidé de mettre en place un CIQ afin de contrôler l'intégrité des oèses calibrées qui conditionne le résultat du DBU⁽⁶⁾. L'utilisation d'une souche de référence d'*Escherichia coli* CIP 7624 va permettre de réaliser ce CIQ en utilisant différentes concentrations bactériennes et de comparer le résultat avec l'abaque fournie par I2a (annexe V). Le CIQ est enregistré dans le SIL ce qui permet de générer une étiquette code-barres qui pourra être lue par le Prelud[®]. Les résultats du CIQ sont saisis dans le SIL selon la procédure qui a été rédigée. La fréquence de cette opération est de toutes les 3 semaines.

La vérification de la non-contamination bactérienne nécessite, elle aussi, l'utilisation de la même souche de référence. Elle est réalisée en utilisant les oèses et les boules de Trigalski, outils utilisés pour ensemercer les ECBU et les PV. Elle suit la même procédure que pour le dénombrement bactérien à une fréquence identique.

La fréquence de « toutes les 3 semaines » a été choisie par le PH Microbiologiste référent et RAQ en raison des contraintes de temps et de budget.

➤ Vérification de méthode ⁽⁸⁾

D'après la norme 15 189 la validation est abordée au niveau des § 5.3 et 5.5 et indique :

"Il doit être démontré (lors de l'installation et au cours de l'utilisation courante) que le matériel est capable d'atteindre les performances requises et qu'il est conforme aux spécifications se rapportant aux analyses concernées. La direction du laboratoire doit élaborer un programme de surveillance régulière permettant de démontrer l'adéquation de l'étalonnage et du fonctionnement des instruments, des réactifs, et des systèmes analytiques. Elle doit également instaurer un programme de maintenance préventive documenté et enregistré respectant, au minimum, les recommandations du fabricant."

L'utilisation du formulaire SH FORM 44 nous permet d'évaluer les performances qualitatives de la méthode. Pour cela nous avons utilisé et adapté le protocole de validation du Prelud® fourni par le fournisseur, I2A.

La portée d'accréditation concernée est décrite dans le SH INF 50 ⁽⁷⁾ dont voici l'extrait :

Code	Nature de l'échantillon biologique	Nature de l'examen/analyse	Principe de méthode	Référence de la méthode	Remarques (limitations, paramètres, critiques...)
BA2	Echantillons 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 (A), 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)

Tableau 1 : SH INF 50-rév. 01 – 1^{er} janvier 2014 Sous domaine : Microbiologie Famille : Bactériologie (BACTH)

Avant de mettre en routine le Prelud®, 4 étapes sont nécessaires.

Première étape : L'étude de la reproductibilité

L'évaluation de la reproductibilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour la même analyse dans des conditions standardisées, avec le même lot de milieux de culture, le même outil (oëse ou Trigalski), la même suspension suspensions à 0,5 MacFarland de la souche de référence *E.coli* CIP 7624 et des opérateurs différents.

Pour les oëses calibrées de 10µL, l'évaluation de la reproductibilité a été réalisée conformément au protocole de validation du fournisseur (Annexe VI). Le schéma d'ensemencement utilisé est celui programmé pour le DBU. Quinze DBU par oëse sont recommandés.

Pour les boules de Trigalskis, l'évaluation de la reproductibilité a été réalisée conformément au protocole de validation du fournisseur. (Annexe VI). Le schéma d'ensemencement utilisé est celui programmé pour les PV. Dix ensemencements par boule de Trigalski sont recommandés.

Deuxième étape : Evaluation de la contamination bactérienne

Cette étape est réalisée avec 3 souches référencées : *E.coli* CIP 7624, *S.aureus* CIP 7625, *P.aeruginosa* CIP 76110 à partir desquelles nous avons réalisé des suspensions à 0,5 MacFarland. Chaque suspension bactérienne ensemencée est suivie immédiatement par l'ensemencement de 2 tubes d'eau stérile. Les 6 outils sont testés pour chaque souche. Cette évaluation nous permet de vérifier qu'il n'y a pas de contamination inter-échantillons.

Troisième étape : Evaluation du dénombrement bactérien

Cette étape n'est pas recommandée par le fournisseur mais il nous a semblé judicieux d'évaluer le DBU effectué par chaque oëse. Elle consiste à dénombrer les colonies bactériennes issues de l'ensemencement de huit suspensions préparées extemporanément et contenant de 10^8 à 10^9 UFC/mL.

Le résultat est comparé à l'abaque fournit par I2A. (Annexe V).

Quatrième étape : Comparaison de méthode

La comparaison porte sur les méthodes d'ensemencement manuel, méthodes de référence utilisées dans le service avec celles effectuées par le Prelud®.

Le Prelud® reproduit l'ensemencement manuel. Il débouche et rebouche les tubes, ensemence en fonction de la demande, soit en quadrant pour les PV avec les boules Trigalski, soit en numération pour les ECBU avec les oèses calibrées de 10µL.

Il ensemence automatiquement les milieux à partir de matériels de prélèvements adaptés :

- Pour les Urines : ensemencement par une oèse calibrée de 10µL, à partir de tube bouché boraté de 10 mL
- Pour les prélèvements vaginaux : ensemencement par écouvillon avec milieu de transport (Transwab®), puis isolement en cadran par boule trigalski.

Pour les urines, un prétraitement des échantillons est nécessaire : l'homogénéisation des tubes boratés ainsi que le débouchage et rebouchage manuel sont nécessaires avant lancement sur l'automate. En effet, la pince du Prelud® débouche les tubes boratés de 4mL sans débouchage préalable mais pas les tubes boratés de 10mL. Pour ces tubes, il existe un vide calibré trop important et le plastique des bouchons est trop mou : la pince ne peut déboucher les tubes sans ce prétraitement.

Pour les PV, le prétraitement des échantillons consiste à vérifier la présence de la tige de l'écouvillon dans le bouchon du Transwab®.

La comparaison de méthode entre les 2 techniques a porté sur :

- 84 DBU répartis en 3 lots représentant 30 à 75 % de l'activité journalière. L'intervalle de comparaison est de 1 lot/jour ;
- 40 PV répartis en 4 lots représentant 75 % des PV complets de l'activité journalière. L'intervalle de comparaison est de 1lot/jour.

Nota :

- l'activité du laboratoire pour les DBU est de 13 000 DBU/an soit une moyenne de 43 DBU/jour et celle pour les PV complets est de 3800 PV/an, soit une moyenne de 13 PV/jour ;
- Pour l'ensemencement des ECBU, un milieu de culture CPS est utilisé.
- Pour l'ensemencement des PV, 5 milieux gélosés (COS, VCN, CHOC, CPS et GBS) sont utilisés.

4 RESULTATS

4.1 MAITRISE DE LA MATIERE

- La maîtrise des conditions de recueil des ECBU (stérile lorsqu'il n'y a pas d'infection)

Elle est évaluée par le nombre de flore polymorphe non étudiée (FPNE) obtenues à la culture provenant de tous les services confondus. L'étude a été affinée sur la provenance des échantillons : laboratoire d'externes, service des Urgences et des patients hospitalisés.

Ainsi sur les 84 ECBUensemencés, 25% montrent une FPNE à la culture. Parmi ces ECBUs « contaminés », 15% ont été obtenus par voie naturelle et montrent une contamination par la flore commensale et 10% sont issus de patients porteurs de sonde à demeure, dont la vessie est colonisée par plusieurs germes. La qualité du prélèvement est meilleure aux urgences, une nouvelle information va très rapidement être effectuée auprès du laboratoire d'externes et des services de soins car la proportion de FPNE dans cette étude est très élevée. Cet indicateur qualité va être mis en place afin de suivre la qualité du prélèvement.

N=84 DBU	< 10 ² UFC/mL	FPNE ≥ 10 ³ UFC/mL	>10 ⁴ UFC/mL 1 ou 2 type(s) bactérien(s)
Ts services confondus %	46%	25%	29%
Externes 9,5%	37,5%	37,5%	25%
Urgences 25%	48%	14%	38%
Hospitalisés 65,5%	46%	27%	27%

Tableau 2 : Synthèse de l'étude portant sur les FPNE

Pour les PV, l'étude ne peut être réalisée, car nous mettons en culture des sécrétions vaginales. Il est donc difficile de savoir si oui ou non les modalités de prélèvement sont respectées, néanmoins cet acte est réalisé par les médecins, praticiens hospitaliers, sage-femme et internes.

➤ La maîtrise du délai d'acheminement

A l'heure actuelle, l'utilisation des milieux de transport pour les PV et l'utilisation de tubes boratés, nous permet d'être plus souples quant aux délais d'acheminement des échantillons urinaires et génitaux au service de Microbiologie. Pendant la garde de nuit, ces échantillons sont envoyés au DBM et sont conservés à température ambiante. Les conditions préconisées par le fabricant sont respectées, cela n'a donc pas d'impact sur la culture bactérienne.

4.2 MAITRISE DU MILIEU

➤ Température de la pièce

Le Prelud[®] est placé dans une pièce qui est actuellement « semi-climatisée ». En effet, cette pièce est divisée en 2 parties, la première étant celle où ont lieu les ensemencements (à l'aide du Prelud[®] et en technique manuelle), la seconde est reliée à la première par un couloir où se trouve le BactAlert[®]. La climatisation est localisée dans la pièce du BactAlert[®]. Une sonde de mesure de la température ambiante a été placée à proximité du Prelud[®] et des mesures s'effectuent toutes les 10 minutes, les normes définies par le fournisseur sont comprises entre 20°C +/- 5 °C. Le logiciel de surveillance ThermoClient[®] permet de voir si les normes sont respectées. Dans le cas contraire, une alarme s'affiche sur le logiciel. Le tracé est vérifié quotidiennement.

➤ Les enceintes thermiques : étuves et réfrigérateurs

La surveillance des températures des enceintes thermiques est effectuée selon le même mode que précédemment, à savoir l'utilisation de sondes de température qui sont reliées au logiciel ThermoClient[®].

Les milieux de culture sont conservés dans un réfrigérateur dont la température est de 5°C +/- 3°C.

Ensemencés par le Prelud[®], les boîtes de Pétri sont incubées dans une étuve dont la température est de 35°C +/- 3°C.

➤ Conditions de stockage des milieux de culture et consommables

Nous avons défini les EMT de la pièce grâce au formulaire qui a été complété.

Ainsi, pour les consommables et d'après les recommandations des fournisseurs, ceux-ci doivent être conservés à température ambiante ou au maximum à + 25°C et avec une tolérance pouvant aller jusqu'à leur date de péremption.

Pour les milieux de culture, les recommandations des fournisseurs sont différentes et nous devons utiliser les milieux à température ambiante car le Prelud® ne tolère « ni les boîtes humides, ni cassées ».

Les milieux chromogéniques de type CPS ou GBS doivent être conservés à l'abri de la lumière. Lors de la réception, ils sont conservés dans leur boîte d'origine entre 2 et 8 °C et jusqu'à la date de péremption. Placés à température ambiante, ôtés de leur sachet et conservés à l'abri de la lumière, leur conservation est limitée à 4,6 jours. Pour satisfaire à notre activité, un coffret au minimum est consommé par jour. Nous maîtrisons donc la conservation des milieux.

Pour les autres milieux gélosés comme les géloses Columbia additionnées de 5% de sang de mouton, les géloses Chocolat + polyvitex et les géloses chocolat + polyvitex+VCAT3, les conditions de conservation sont les mêmes que précédemment sauf qu'ils ne nécessitent pas d'être conservés à l'abri de la lumière une fois les sachets ouverts. Leur conservation dans ces conditions est limitée à 4,6 jours. Un coffret au minimum de chaque est utilisé par jour, la conservation des milieux est donc maîtrisée.

➤ Gestion des dates de péremption

A l'heure actuelle la gestion des stocks est réalisée manuellement. L'arrivée du logiciel de stock, GesStock, va nous permettre de mieux maîtriser cette étape.

4.3 MAITRISE DU MATERIEL

La formation puis l'habilitation du personnel technique ont permis de vérifier la maîtrise du Prelud ® ; La mise en place de la procédure d'utilisation du Prelud ® est un outil complémentaire à cette maîtrise.

Le guide de maintenance d'utilisateur fournit par I2A permet de trouver les différents protocoles de nettoyages des différentes parties de l'automate, ainsi qu'un tableau récapitulatif des maintenances à réaliser et leur fréquence. Un tableau de traçabilité a été mis en place (Annexe VIII).

En cas de panne mécanique ou SIL, 2 procédures ont été rédigées : Une procédure d'utilisation en mode dégradé et une procédure en cas de panne informatique. Un cahier de vie permet de noter les dysfonctionnements du Prelud ® et de les tracer. Tout le personnel technique maîtrise ces procédures.

Les 3 souches de référence, *E.coli* CIP 7624, *S.aureus* CIP 7625, *P.aeruginosa* CIP 76110 sont aliquotées, identifiées et congelées à - 80 °C conformément aux recommandations du fournisseur.

La vérification des dates de péremption des milieux gélosés, Transwab® et tubes boratés s'effectue avant le lancement sur le Prelud® par toute personne habilitée. La cadre vérifie régulièrement l'état des stocks de gélose, dont les dates de péremption.

4.4 MAITRISE DE LA MAIN-D'ŒUVRE

La formation a été effectuée et est contrôlée par pointage et émargement de l'ensemble du personnel. La procédure d'utilisation en routine rédigée a été prise en compte.

Les critères d'habilitation du personnel ont été définis. La vérification de la maîtrise de l'utilisation du Prelud® s'effectue à l'aide d'un questionnaire (Annexe VII).

Les principaux critères d'habilitation à satisfaire sont décrits dans le tableau ci-dessous. Ces critères concernent l'utilisation l'ensemble du poste de travail correspondant à l'ensemencement des prélèvements.

Critères	H*	Date	Visa	Renouvellement habilitation
Savoir utiliser le PRELUD®				
Connaitre l'organisation du poste de travail				
Savoir gérer l'accueil téléphonique				
Savoir gérer les stocks de milieux de culture				
Savoir gérer les maintenances du Prelud®				
Savoir gérer les dysfonctionnements				
Savoir maitriser la procédure dégradée en cas de panne informatique ou mécanique du Prelud®				
Savoir réaliser la non contamination et du DBU (CIQ)				
Savoir maitriser l'arrêt d'urgence du Prelud®				
Savoir maitriser les connexions informatiques (MOLIS, Sirweb)				
Connaitre la prise en charge des échantillons				
Résultats obtenus au questionnaire:				

Tableau 3 : Critères d'habilitation à satisfaire

Pour que l'habilitation soit effective, il faudra aussi tenir compte :

- du temps d'occupation du poste de travail sur une période de 3 mois : 10 jours/trimestre
- du nombre d'échantillons ensemencés sur cette même période : soit 150 PV/ 3mois et 500 ECBU/3mois

4.5 MAITRISE DE LA METHODE

4.5.1 Suivi du CIQ et de la non-contamination bactérienne

Un planning annuel a été défini pour la réalisation de l'évaluation du dénombrement bactérien(CIQ) et pour la vérification de la non-contamination inter-échantillons, la périodicité étant de toutes les 3 semaines.

➤ Dénombrement bactérien/CIQ

Les résultats obtenus à l'aide de l'abaque du fournisseur concernent chacune des 3 oèses et sont saisis dans le SIL puis validés par le PH Microbiologiste du secteur concerné.

NUMERATION	Séquence 1 Numération 10^5	Séquence 2 Numération 10^4	Séquence 3 Numération 10^3
Résultats attendus des 3 oèses	10^5 E coli UFC/mL	10^4 E coli UFC/mL	10^3 E coli UFC/mL
Interprétation	Conforme	Conforme	Conforme

Tableau 4 : Dénombrement bactérien/CIQ

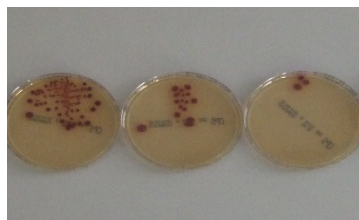


Photo 1 : Dénombrement bactérien/CIQ

Un résultat conforme montre que le DBU/CIQ est juste et confirme donc que le volume d'échantillon ensemencé par les oèses est correct et est bien de 10 μ L. Si le DBU effectué par une oèse n'est pas conforme aux résultats attendus, celle-ci est désactivée et le PH Microbiologiste du secteur est prévenu afin de décider de la conduite à tenir.

Jusqu'à présent, aucun DBU ne s'est avéré non conforme aux résultats attendus.

➤ Contamination bactérienne inter-échantillons/CIQ

Les résultats sont conformes aux résultats attendus et montrent qu'il n'y pas de contamination inter-échantillons. Ils sont saisis dans le SIL puis validés par le PH Microbiologiste du secteur concerné.

CONTAMINATION	Séquence 1 E coli	Séquence 2 Eau stérile 1	Séquence 2 Eau stérile 2
Résultats attendus pour chacun des 6 outils	$>10^5$ <i>E coli</i> / mL	$< 10^2$ UFC/mL ou culture négative	$<10^2$ UFC/mL ou culture négative
Interprétation	Conforme	Conforme	Conforme

Tableau 5 : Contamination bactérienne inter-échantillons/CIQ



Photo 2 : Contamination bactérienne inter-échantillons/CIQ

Si le résultat est conforme, il n'y a pas de contamination entre les échantillons, prouvant que le PSM et le stérilisateur remplissent bien leurs fonctions.

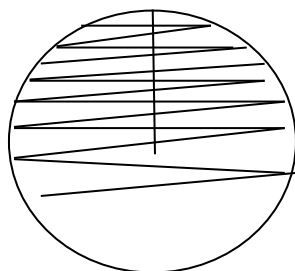
Si le résultat n'est pas conforme pour un ou plusieurs outils, celui-ci ou ceux-ci sont désactivés et le PH Microbiologiste du secteur est prévenu afin de décider de la conduite à tenir.

Jusqu'à présent, aucune contamination inter-échantillon n'a été constatée.

4.5.2 Evaluation de la Reproductibilité

➤ Oëses

Selon le protocole du fournisseur, le dénombrement des colonies doit atteindre les $\frac{3}{4}$ de la gélose. La lecture des milieux de culture ensemencés s'effectue après une incubation à 35 ± 3 °C durant 18h à 24h.



Un récapitulatif des méthodes de dénombrement bactérien est présenté ci-dessous sous forme de tableau, puis de photos.

DENOMBREMENT BACTERIEN					
Type ensemencement	Type de tube	Outil dépôt	Outils ensemencement	Résultat attendu	Résultat obtenu
Numération	Tube bouché	Oëse 1	Oëse 1	15 boîtes reproductibles	Cf. Photo 3
Numération	Tube bouché	Oëse 2	Oëse 2	15 boîtes reproductibles	Cf. Photo 4
Numération	Tube bouché	Oëse 3	Oëse 3	15 boîtes reproductibles	Cf. Photo 5

Tableau 6 : Reproductibilité oëse

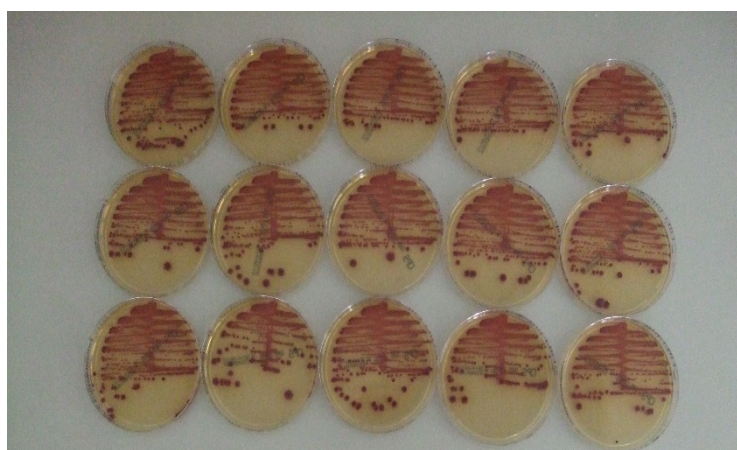


Photo 3 : Reproductibilité oëse 1

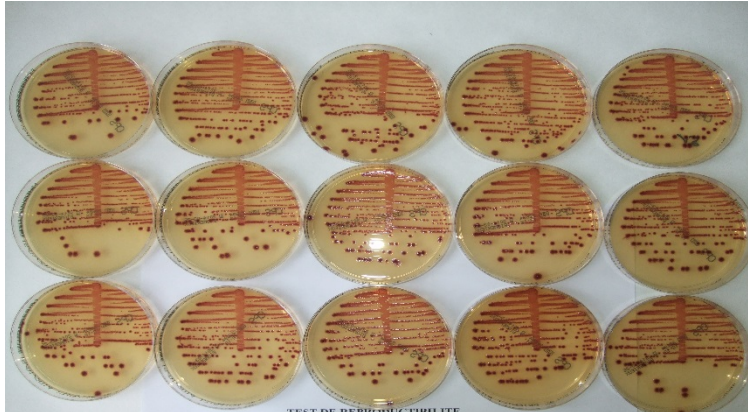


Photo 4 : Reproductibilité oëse 2

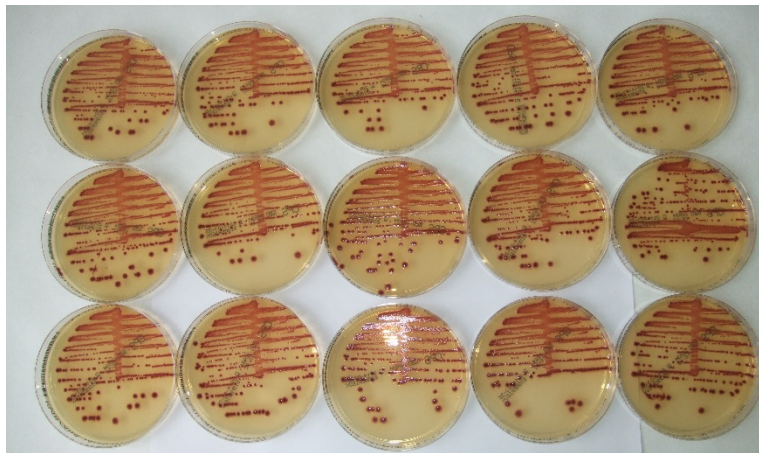
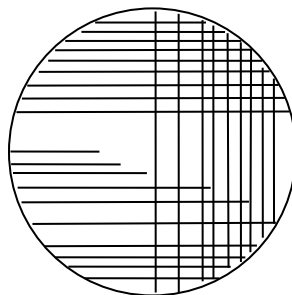


Photo 5 : Reproductibilité oëse 3

Les résultats pour chaque oëse sont concluants. Les outils donnent des résultats reproductibles.

➤ Boules de Trigalski

L'isolement des colonies doit être similaire à l'image ci-dessous. La lecture des milieux de cultureensemencés s'effectue après une incubation à 35+/- 3 °C durant 18h à 24h.



Un récapitulatif des méthodes « Qualitatives » est présenté sous forme de tableau, puis de photos :

METHODES QUALITATIVES					
Type ensemencement	Type de tube	Outil dépôt	Outils ensemencement	Résultat attendu	Résultat obtenu
Quadrant	Swab	Ecouvillon	Trigalski 1	10 boîtes reproductibles	Cf. Photo 6
Quadrant	Swab	Ecouvillon	Trigalski 2	10 boîtes reproductibles	Cf. Photo 7
Quadrant	Swab	Ecouvillon	Trigalski 3	10 boîtes reproductibles	Cf. Photo 8

Tableau 7 : Reproductibilité Boules de Trigalski

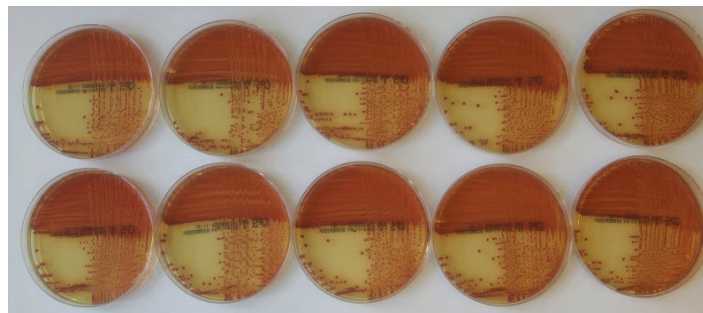


Photo 6 : Trigalski 1

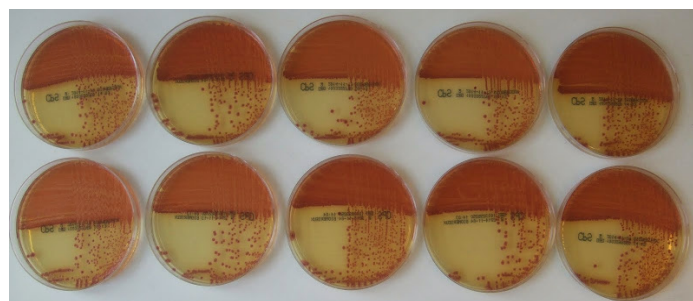


Photo 7 : Trigalski 2

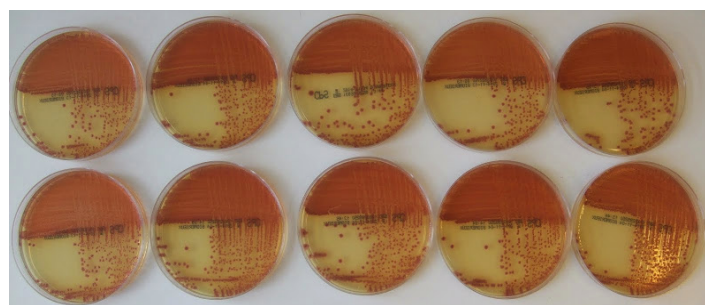


Photo 8 : Trigalski 3

Les résultats pour chaque boule Trigalski sont concluants : les outils donnent des résultats reproductibles.

4.5.3 Evaluation de la contamination bactérienne

Les résultats de l'évaluation de la contamination bactérienne sont concluants, en effet pour chaque outil, il n'y a pas de contamination inter-échantillon, la lecture des milieux de culture s'effectue après une incubation à 35+/- 3 °C durant 18h à 24h.

Les résultats sont reportés dans un tableau, puis illustrés pour chaque outil.

CONTAMINATION	<i>E coli</i> CIP 7624	Blanc 1	Blanc 2	<i>Saureus</i> CIP 7625	Blanc 1	Blanc 2	<i>Pyo</i> CIP 76110	Blanc 1	Blanc 2
Résultats attendus des différents outils	<i>E coli</i>	Négatif	Négatif	<i>S aureus</i>	Négatif	Négatif	<i>Pyo</i>	Négatif	Négatif
Interprétation	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme

Tableau 8 : Evaluation de la contamination bactérienne

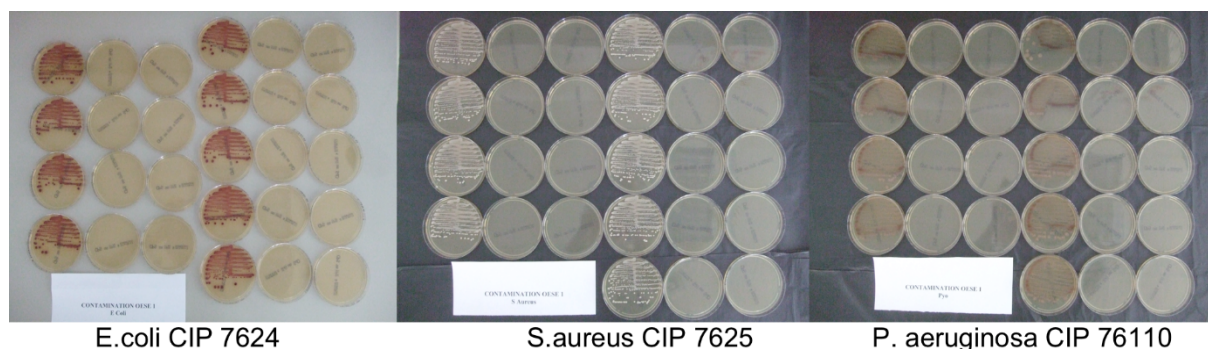


Photo 9 : Résultat pour l'oëse 1

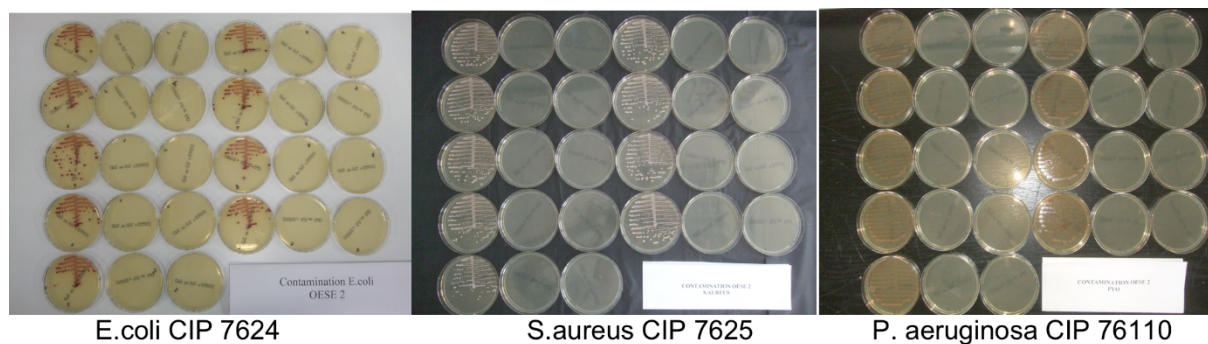


Photo 10 : Résultat pour l'oëse 2

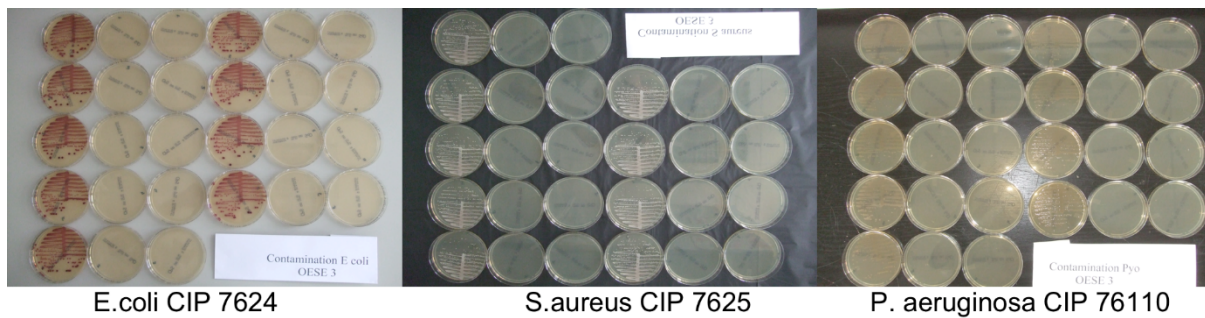


Photo 11 Résultat pour l'oëse 3

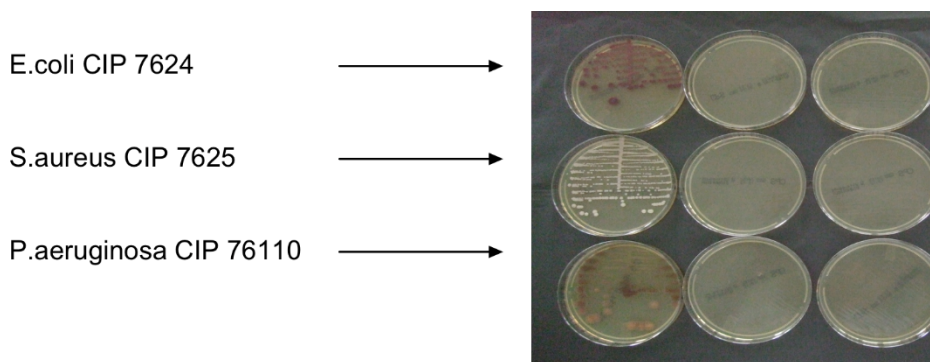


Photo 12 : Résultat pour le trigalski 1

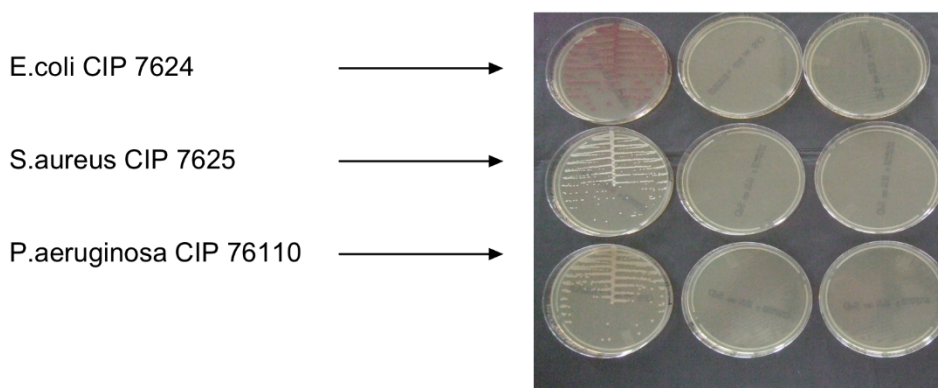


Photo 13 : Résultat pour le trigalski 2

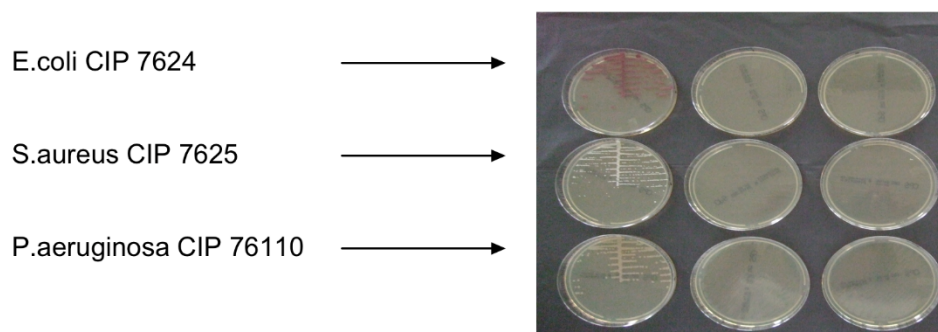


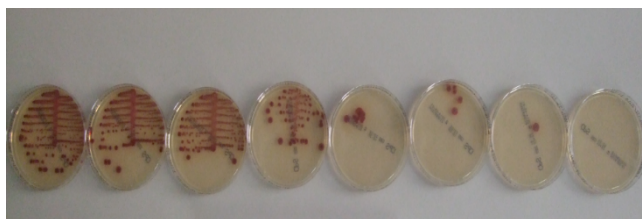
Photo 14 : Résultat pour le trigalki 3 :

4.5.4 Evaluation du dénombrement bactérien (DB)

Cette étape aussi a donné des résultats concluants. Les DB constatés à l'aide de l'abaque fourni par I2A sont présentés grâce aux photos suivantes.

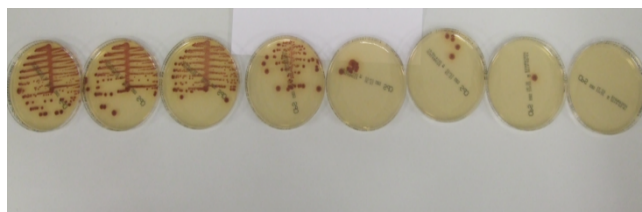
Cette étape rajoutée par le laboratoire, nous permet de rendre des résultats cohérents et comparables avec la technique manuelle antérieurement utilisée. La lecture des milieux de culture s'effectue toujours après une incubation à + 35 °C +/- 3 °C durant 18 à 24 h.

Des photos illustrent très bien ces numérations bactériennes qui ont été réalisées sur les 3 oèses.



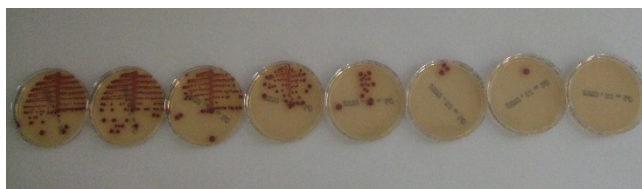
UFC/m	10⁸	10⁷	10⁶	10⁵	10⁴	10³	10²	10¹
L								

Photo 15 : Numération E.coli oèse 1



UFC/m	10⁸	10⁷	10⁶	10⁵	10⁴	10³	10²	10¹
L								

Photo 16 : Numération E.coli oèse 2



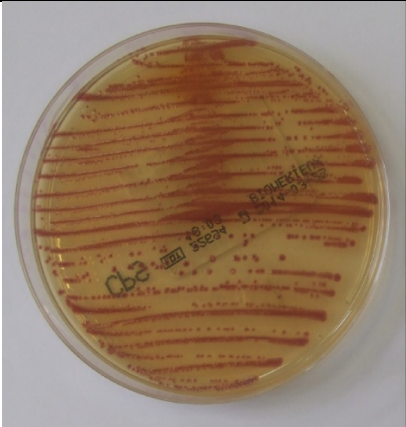
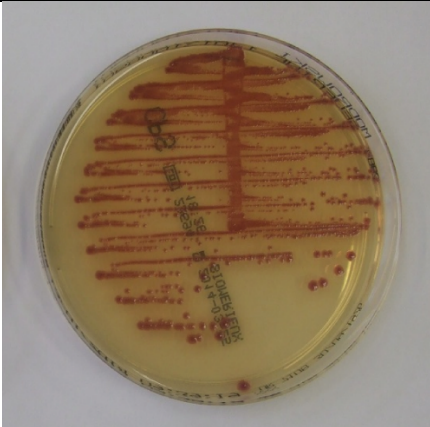
UFC/m	10⁸	10⁷	10⁶	10⁵	10⁴	10³	10²	10¹
L								

Photo 17 : Numération E.coli oèse 3

4.5.5 Comparaison de méthodes

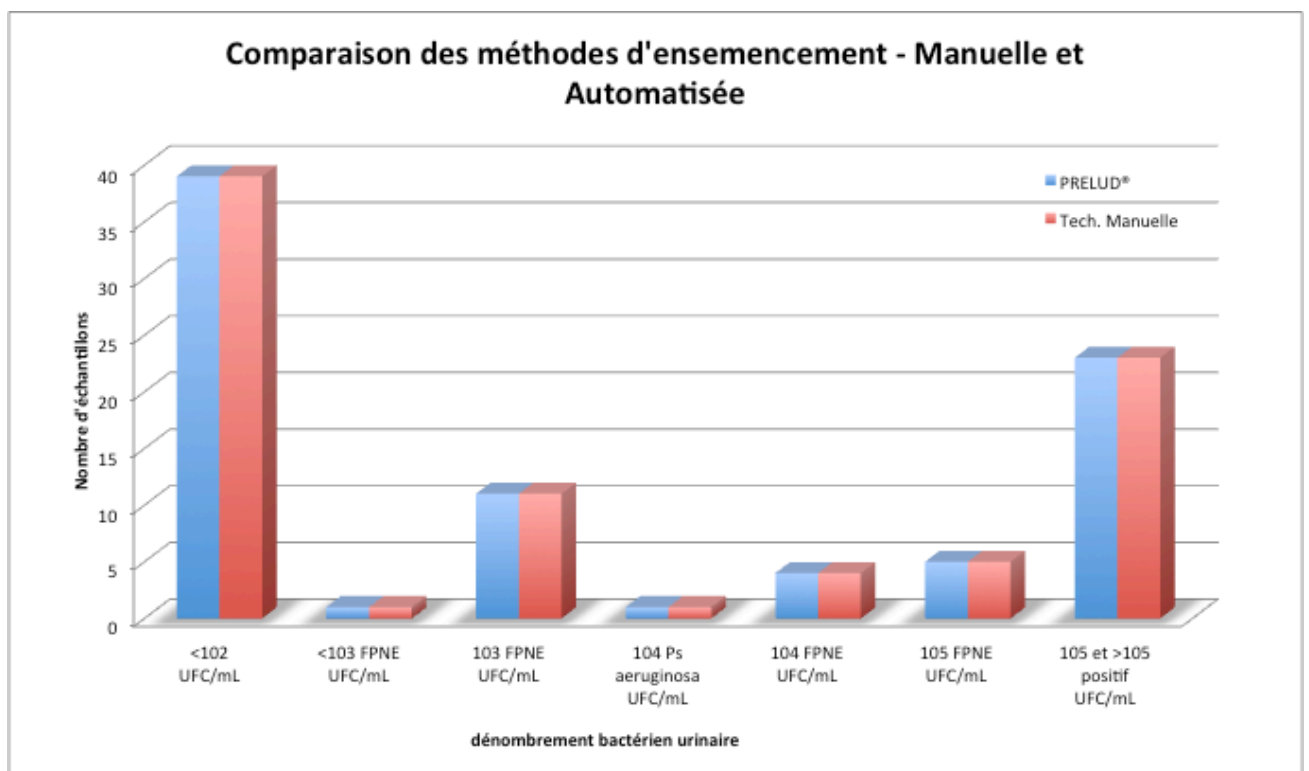
Nous avons comparé les techniques d'ensemencement manuel en place dans le service de Microbiologie issues des recommandations du Référentiel en Microbiologie médicale (REMIC)⁽⁹⁾ avec les techniques automatisées du Prelud®.

Pour le DBU, la comparaison entre les 2 techniques est effectuée après l'incubation des géloses durant 18h à 24h à 35°C +/- 3°C sous une atmosphère normale. Chaque boîte est comparée avec l'abaque fournit par I2A et donne un très bon résultat. Les milieux ensemencés selon les 2 techniques sont photographiés et enregistrés dans un document qui mentionne le numéro de dossier et l'examen microscopique associé au DBU, comme le représente l'exemple ci-dessous :

N° Dossier : 1403 0070	
<u>Examen microscopique</u>	
Sondage aller/retour	
Cellules épithéliales : Absence	
Numération hématies : <1000/mL	
Numération des leucocytes : 123 000/mL	
Coloration de Gram : Quelques Bacilles Gram –	
MANUELLE	PRELUD®
	
>10 ⁵ E.coli UFC/mL	>10 ⁵ E.coli UFC/mL

La comparaison de méthode a porté sur un échantillon de 84 DBU, la synthèse des résultats obtenus est illustrée par le Graphe 2.

N = 84 ECBU	<10 ² UFC/mL	<10 ³ FPNE UFC/mL	10 ³ FPNE UFC/mL	10 ⁴ Pyo UFC/mL	10 ⁴ FPNE UFC/mL	10 ⁵ FPNE UFC/mL	10 ⁵ positif UFC/mL
PRELUD®	39	1	11	1	4	5	23
Tech. Manuelle	39	1	11	1	4	5	23
Comparaison	équivalent	équivalent	équivalent	équivalent	équivalent	équivalent	équivalent



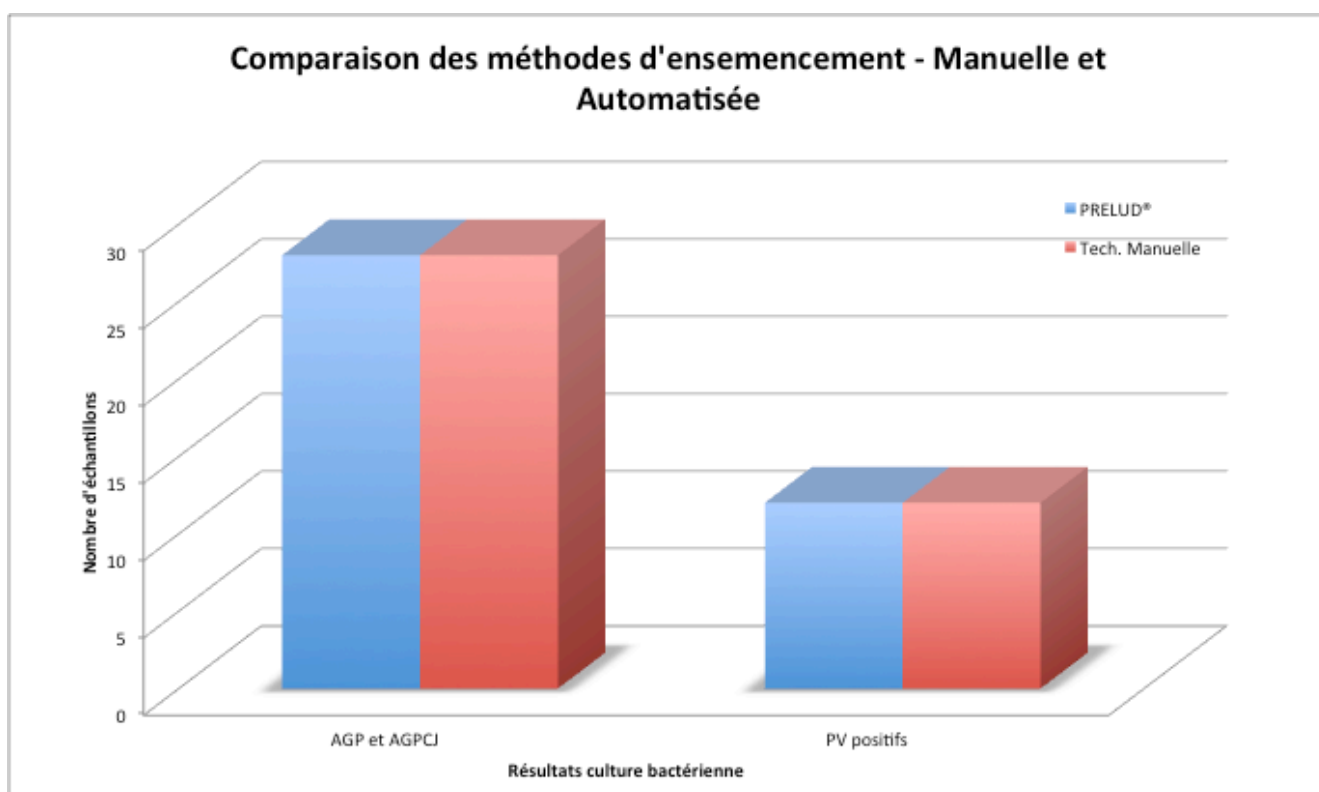
Graph 2 : Comparaison de méthode entre le « Prelud® » et la technique manuelle de référence pour le dénombrement bactérien urinaire (DBU)

Pour les PV, la comparaison est aussi réalisée après l'incubation des géloses durant 18h à 24h à + 35 °C +/- 3 °C, sous différentes atmosphères qui dépendent du milieu ensemencé (atmosphère normale, sous CO2 et en anaérobiose). Chaque boîte est comparée avec son homologue et donne de bons résultats. Les boîtes ensemencées selon les 2 techniques sont photographiées et enregistrées dans un document qui mentionne le numéro de dossier et l'examen microscopique associé à la paire de boîtes, selon l'exemple ci-dessous :

N° Dossier : 1408 0956	
<u>Examen microscopique</u>	
<p>Très nombreuses cellules épithéliales Nombreuses Hématies Nombreux Leucocytes Coloration de Gram : Quelques Bacilles Gram + Quelques Coccis Gram +</p>	
Manuelle 24 h	
Prelud 24 h	
Manuelle 48 h	
Prelud 48 h	
Résultat : comparaison des 2 techniques	<i>Streptococcus agalactiae</i> (groupe B)

La comparaison de méthode a concerné 40 PV, la synthèse des résultats obtenus est illustrée par le Graphe 3.

N= 40 PV	AGP et AGPCJ	PV positifs
PRELUD®	28	12
Tech. manuelle	28	12
Comparaison	équivalent	équivalent



Graph 3 : Comparaison de méthode entre le « Prelud® » et la technique manuelle de référence pour les prélèvements vaginaux

Les 2 méthodes sont comparables pour 100% des échantillons. L'ensemencement est de même qualité quelle que soit la technique d'ensemencement : manuelle ou automatisée, que cela soit pour le DBU que pour l'isolement en quadrant. Les colonies sont parfaitement isolées et permettent de poursuivre l'identification bactérienne des colonies d'intérêt.

5 CONCLUSION

La mise en place du Prelud® est effective. La vérification de méthodes pour les 2 types d'échantillons, PV et ECBU, a été réalisée avec succès. A cela, nous avons utilisé la méthode des 5M afin de faire l'analyse des risques avec comme support le SHFORM44.

La matière dont font parties les conditions de recueil des ECBU, va nous permettre de mettre en place un indicateur de qualité avant la fin de l'année, afin de diminuer le nombre de FPNE. A cela, s'ajoute une nouvelle sensibilisation du personnel soignant qui devrait améliorer cette phase de recueil.

L'utilisation de Transwab® et de tubes boratés permettent d'être plus souples quant au délai d'acheminement au laboratoire de Microbiologie.

Les domaines que sont la Main d'œuvre, le Milieu et le Matériel sont maîtrisés. Cependant, l'arrivée du logiciel de gestion de stock GesStock va nous permettre d'améliorer significativement la gestion des stocks réalisés manuellement.

Enfin, la vérification de méthode a été une partie importante de ce travail, elle s'est avérée agréable à réaliser et a donné des résultats très positifs quant aux évaluations de la reproductibilité, de la contamination bactérienne et du DB. La création et la mise en place de CIQ permettent de respecter les recommandations du COFRAC et de vérifier l'intégrité des Oèses et des Trigalskis ainsi que celle du PSM.

La comparaison des deux méthodes d'ensemencement a été réalisée avec succès. La diminution d'ensemencement manuel limite les gestes répétitifs et non valorisants. La plupart du personnel technique s'attèle à d'autres tâches nécessitant plus de temps et d'attention.

D'autres comparaisons d'ensemencements sur d'autres types d'échantillons vont être réalisées afin d'optimiser le rendement du PRELUD®.

Pour conclure, cette vérification de méthode a engendré une augmentation des milieux de culture pour le laboratoire de Microbiologie et donc une augmentation des coûts qu'il faut justifier auprès des services Achats ainsi qu'une augmentation du temps technique donc du personnel.

6 BIBLIOGRAPHIE

- (1) Loi n° 2013-442 du 30 mai 2013 portant la réforme de la biologie médicale
- (2) Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale, et article L6221-2 du Code de la Santé Publique
- (3) QUAMIC, Comité Qualité de la Société Française de Microbiologie, 2014
- (4) SH FORM 44 FICHE TYPE QUALITATIF- Vérification (portée A)/ Validation (portée B) d'une méthode biologie médicale, Révision : #00-04/2011 / date de publication : 23/03/2011
- (5) SH GTA 01 Guide Technique d'Accréditation en biologie médicale
Révision : #00 - 05/2011 | Date de publication : 25/07/2011, § 6.14, 6.15 et 6.16
- (6) SH GTA 06 Guide Technique d'Accréditation-Contrôle Qualité en Biologie Médicale, révision 00- 06/2012
- (7) SH INF 50 : Portées-types d'Accréditation Révision : #01 – 11/2013
- (8) SH GTA 04 : Guide Technique d'Accréditation de Vérification (portée A) / Validation (portée B) des méthodes en Biologie Médicale Révision 00- Avril 2011 (pages 12 et 13 / 46)
- (9) REMIC : Référentiel en Microbiologie Médicale Société Française de Microbiologie, 2010.

7 ANNEXES

Annexe I : Organigramme GCS Biologie Médicale Nord Val D'oise

Annexe II : Organigramme LBM Pontoise

Annexe III : Schéma d'ensemencement, formaliser l'ensemencement manuel grâce au
PRELUD ®

Annexe IV : Formulaire EMT

Annexe V : Abaque dénombrement bactérien fournie par I2A

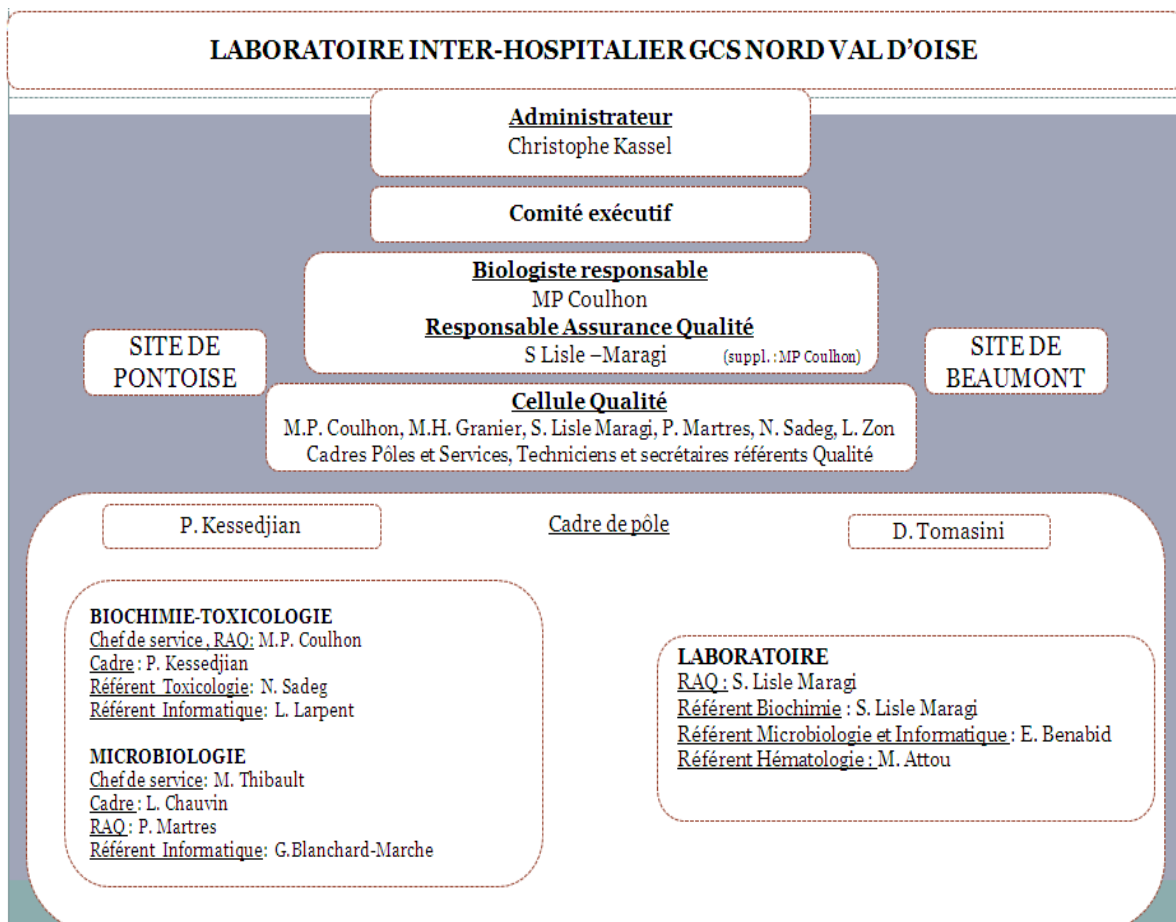
Annexe VI : Extrait du protocole de validation du PRELUD ® fournit par I2A

Annexe VII : Questionnaire

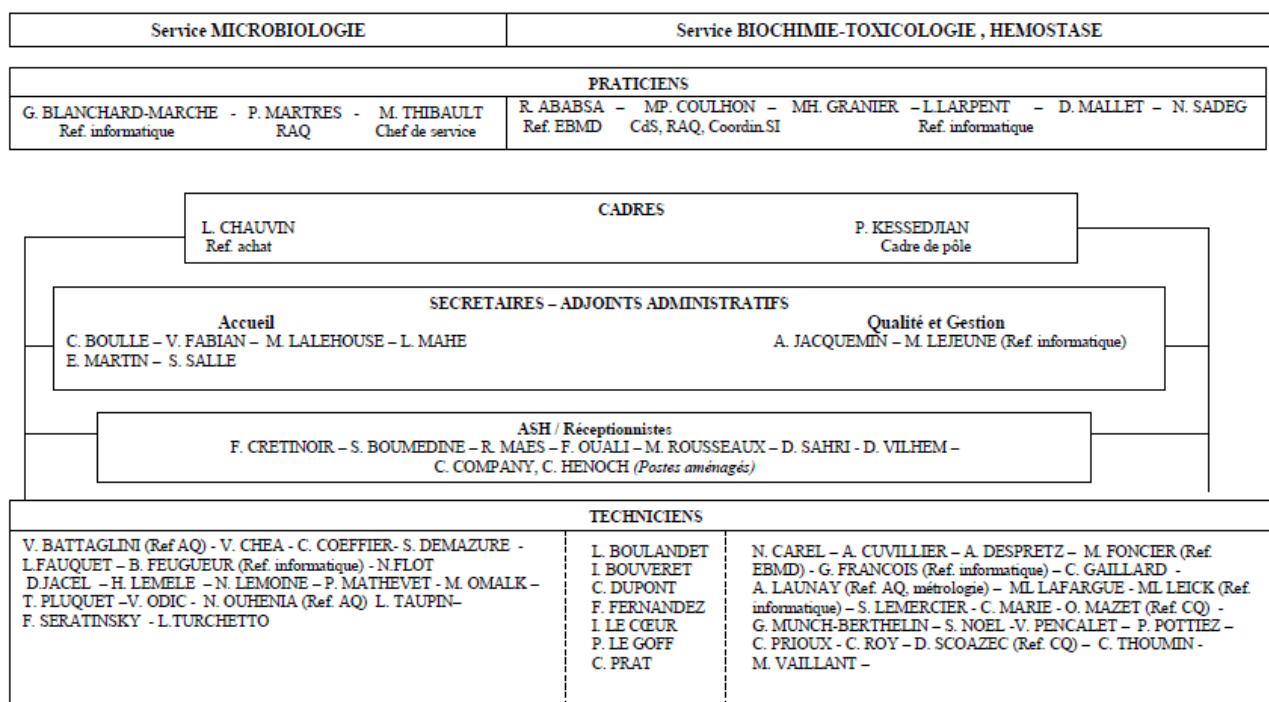
Annexe VIII : Tableau de traçabilité des maintenances

ANNEXE I : ORGANIGRAMME GCS BIOLOGIE MEDICALES NORD VAL

D'OISE



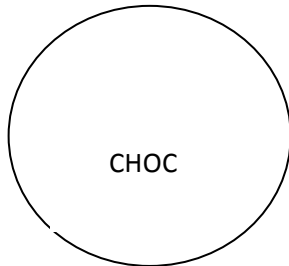
ANNEXE II : ORGANIGRAMME LBM PONTOISE



ANNEXE III : FORMALISER L'ENSEMENCEMENT MANUEL GRACE AU PRELUD

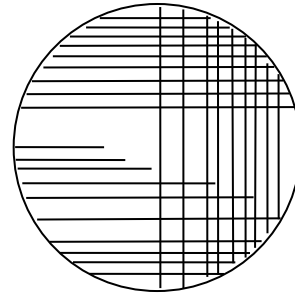
Ensemencement des PV,

Afin de comparer l'ensemencement manuel et l'ensemencement Prélud[®], merci d'ensemencer selon le protocole suivant :



Etape 1

Ensemencer le $\frac{1}{3}$ de la boîte **CHOC** avec l'écouvillon Transwab[®], en le tournant sur lui-même pendant l'ensemencement. **Ne pas reposer l'écouvillon dans le milieu de transport !!!!**



Etape 2

Isoler immédiatement en quadrant avec 1 oëse de 1 μ l et en faisant des stries perpendiculaires au dépôt fait par l'écouvillon

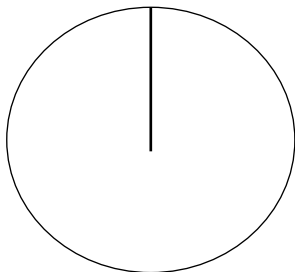
Répéter ces étapes pour la VCN puis la COS

Recharger l'écouvillon dans le milieu de transport

Procéder comme pour les étapes 1 et 2 pour la GBS puis la CPS

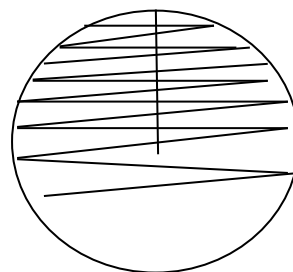
Ensemencement des ECBU,

Afin de comparer l'ensemencement manuel et l'ensemencement Prélud[®], merci d'ensemencer selon le protocole suivant :



Etape 1

Faire une strie centrale sur la boîte **CPS** avec une oëse de 10 μ l préalablement « plongée » dans le tube boraté



Etape 2

Avec la même oëse de 10 μ l, reprendre en haut du dépôt et ensemer en stries serrées jusqu'au bout, comme le montre le modèle ci-dessus