



MEMOIRE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME UNIVERSITAIRE

« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE

DE BIOLOGIE MEDICALE »

VERIFICATION DES PERFORMANCES DE LA COLORATION DE

GRAM : APPROCHE METHODOLOGIQUE

Sonia LAOUIRA-CHERAIT

Année 2016-2017

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 ».

Dr Sonia LAOUIRA - CHERAIT
Biologiste Médicale

Laboratoire de biologie médicale
Département de microbiologie
Hôpital Henri Mondor
51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny,
94010 Créteil



REMERCIEMENTS

Je remercie l'ensemble des intervenants de ce Diplôme Universitaire pour la qualité de leur enseignement.

Je remercie les membres du Jury qui me font l'honneur de juger ce travail.

Enfin, je remercie mon mari de m'avoir soutenu jusqu'au bout, mes enfants, mes amis pour leur encouragements.

SOMMAIRE

GLOSSAIRE	p.1
I. PRESENTATION DU TRAVAIL	p.2
II. GENERALITES	p.2
1. Contexte réglementaire.....	p.2
2. L'accréditation en bactériologie.....	p.3
3. Présentation de l'hôpital	p.4
4. Présentation du laboratoire.....	p.4
5. Le management de la qualité au laboratoire.....	p.5
6. Examen microscopique bactériologique	p.5
7. Examen microscopique après coloration	p.6
III. METHODOLOGIE	p.7
1. Détermination de la portée flexible	p.8
2. Etat des lieux	p.9
3. Description et choix de la méthode	p.10
4. Rédaction des modes opératoires	p.13
5. Mise en place des CQI	p.14
a. Choix des matériaux de contrôle	p.14
b. Rythme	p.15
c. Modalités techniques	p.15
d. Conduite à tenir en cas de CQI non conforme	p.15
6. Analyse des risques	p.16
a. Etude des risques.....	p.16
b. Criticité des réactifs	p.16
c. Moyens de maîtrise	p.17
7. Vérification des performances	p.21
a. Contamination	p.21
b. Comparaison de méthodes	p.23
8. Confirmation des performances en pratique quotidienne	p.25
III. CONCLUSION	p.25
IV. ANNEXES	p.26
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p.30

GLOSSAIRE

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale.

COFRAC : Comité Français d'Accréditation.

ATCC: American Type Culture Collection

CIP: Collection de l'Institut Pasteur

CRBIP : Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur

CQI : contrôle de qualité interne

EEQ : évaluation externe de qualité

I. PRESENTATION DU TRAVAIL

La coloration de Gram qu'elle se fasse manuellement ou grâce à un colorateur, est une étape incontournable mais aussi critique en bactériologie. Elle contribue à la fois au diagnostic clinique et à l'orientation thérapeutique. Elle concerne près de 80% des prélèvements de bactériologie.

Le mémoire traite de la validation des performances de la coloration de Gram en bactériologie.

Dans notre laboratoire, la coloration de Gram est réalisée selon les deux techniques :

- Manuelle
- Automatisée sur le colorateur « **RAL Stainer®** »

Les objectifs de ce mémoire sont :

- de mettre en place **une méthodologie pour la vérification des performances de la coloration de Gram** conformément aux exigences de la norme NF EN ISO 15189,
- d'apporter **certain**s éléments du dossier de vérification/ validation de méthode, selon le formulaire (SH FORM 43) qui pourra être soumis au COFRAC dans le cadre de l'accréditation.

II. GENERALITES

1. Contexte réglementaire

L'ordonnance 2010-49 du 13 janvier 2010, modifiée par la loi 2013-442 du 30 mai 2013, rend obligatoire l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) **(1-2)** selon la norme internationale NF ISO 15189 qui en précise les exigences particulières**(3)**.

L'accréditation en biologie médicale doit être perçue comme une approche méthodologique et un outil destiné à faire progresser la qualité de nos analyses et à valoriser notre discipline.

Le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) est le seul organisme en France habilité à délivrer l'accréditation d'un LBM.

La loi du 30 mai 2013 a prévu un échéancier pour parvenir à une accréditation des LBM à 100% en 2020, avec des étapes intermédiaires de 50% des examens de biologie médicale au 1^{er} novembre et 70% au 1^{er} novembre 2018.

L'étape intermédiaire fixée au 1^{er} novembre 2018 a été supprimée par la loi du 09 décembre 2016 (article 147 de la loi 2016-1691 dite loi Sapin 2).

L'arrêté du 04 novembre 2015 publié le 11 novembre 2015 a modifié la liste des familles du domaine de la biologie médicale. La révision des documents SH REF 08 et SH INF 50 a débuté pour prendre en compte cet arrêté. Les familles d'examens sont désormais réunies en 3 familles :

- ° Famille n°1 : Biochimie – Génétique,
- ° Famille n°2 : Immunologie – Hématologie – Biologie de la reproduction,
- ° Famille n°3 : Microbiologie.

2. L'accréditation en bactériologie

La microbiologie médicale est fondamentalement différente des autres spécialités biologiques car elle s'intéresse au monde du vivant. Aussi, elle ne peut être appréhendée, en matière d'accréditation, de la même manière que les autres disciplines telles que la biochimie et l'hématologie, pour lesquelles les analyses visent à effectuer le dosage d'un substrat ou d'un constituant au sein d'un liquide biologique.

L'accréditation en bactériologie est plus difficile à mettre en œuvre en raison de ces spécificités liées à la nature des échantillons biologiques (diversité des matrices), à la diversité des localisations anatomiques des prélèvements et d'une automatisation encore partielle laissant une large place aux techniques manuelles. De plus le résultat d'une analyse bactériologique est souvent la conclusion de l'expertise de plusieurs étapes analytiques automatisées ou non, qualitative ou quantitative.

Discipline en constante évolution. Des outils, aujourd'hui essentiels tels que les automates de coloration, de numération, d'ensemencement, d'identification rapide ou de réalisation d'antibiogramme, sont proposés aux microbiologistes.

La vérification des performances en microbiologie se fait majoritairement sur un mode qualitatif. Elle repose en grande partie sur l'analyse bibliographique et la maîtrise des risques mais aussi sur des vérifications expérimentales in situ. **(5)**

3. Présentation de l'hôpital

L'hôpital Henri-Mondor est à la fois un hôpital de référence et un hôpital de proximité, qui travaille dans une logique de coordination et de complémentarité avec les structures de santé régionales et locales. Il appartient au groupe hospitalier (GH) Henri Mondor de l'assistance publique des hôpitaux de Paris.

Le GH regroupe 5 établissements du sud est de Paris :

- Le Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Henri-Mondor et l'hôpital de soins de suite et de réadaptation (SSR) Albert-Chenevier situés à Créteil offrent environ 1000 lits de court séjour et SSR. Ils sont en partie spécialisés dans la prise en charge médico-chirurgicale des greffes et transplantations.
- Emile-Roux dans le Val-de-Marne, Joffre-Dupuytren et Georges-Clemenceau en Essonne, offrent une importante filière gériatrique d'environ 2000 lits.

L'hôpital Henri-Mondor est constitué de 11 pôles. Il est aussi le siège du SAMU 94. Il dispose d'un SMUR avec un hélicoptère permettant d'accueillir des patients en état critique ou les transferts de greffe.

Le GH est rattaché à la faculté de médecine Paris-Est Créteil, qui accueille 3 000 étudiants. La faculté de médecine de Créteil est une composante de l'université Paris-Est Créteil Val-de-Marne. Une convention avec l'école vétérinaire de Maisons-Alfort a permis de constituer le 1er pôle santé humaine et animale

4. Présentation du laboratoire

Le laboratoire de biologie médicale du CHU Henri Mondor constitue le seul laboratoire du GH. Il réalise une activité de près de 126 millions de B et BHN soit plus de 4 millions d'actes par an. Il s'organise en différents services : biochimie-

génétique ; pharmacologie-toxicologie ; anatomo- cytologie ; histo-embryologie ; bactériologie-hygiène –virologie- parasitologie- mycologie ; hématologie biologique – hémostasie ; immunologie biologique et centre de tri inter-sites.

L'unité de bactériologie-hygiène hospitalière se trouve dans le département de microbiologie. Elle comprend 5.5 biologistes en équivalent temps plein, 3 internes du DES biologie médicale et environ 20 techniciens de laboratoire.

5. Le management de la qualité au laboratoire

Pour répondre aux objectifs « qualité » du 30 mai 2015, la stratégie mise en place par le pôle Biologie –Pathologie du GH Henri Mondor, est que chaque secteur de biologie médicale, en fonction des familles auxquelles appartiennent les analyses, dépose une demande d'accréditation pour 50% de l'activité avant le 31 octobre 2015.

Ainsi, au 1^{er} septembre 2015, le LBM de l'Hôpital Henri Mondor est accrédité pour 50% de ces analyses. L'unité de bactériologie-hygiène a pour cela constitué son dossier pour accréditer l'antigénurie légionnelle et la cytologie urinaire qui représentent plus de 50% de l'activité de l'unité. L'audit a eu lieu, avec succès, en janvier 2017.

La démarche qualité au sein de l'unité de bactériologie est maintenant entamée. Les analyses candidates au prochain dépôt de dossier sont : l'identification bactérienne par spectrométrie de masse Andromas®, l'antibiogramme par test automatisé Microscan® et l'ensemencement par technique automatisée Wasp®.

8. Examen microscopique bactériologique

L'examen microscopique en bactériologie peut être effectué sans coloration de l'échantillon par observation directe entre lame et lamelle (technique de l'état frais), ou bien après coloration, ou encore après réaction d'immunofluorescence. **(6)**

Cet examen renseigne sur la présence de bactéries confirmant l'origine bactérienne d'une infection (morphologie, propriétés tinctoriales particulières après coloration de

Gram ou coloration de Ziehl- Neelsen), ce qui représente un élément majeur pour une prise en charge thérapeutique adaptée. Ainsi, cet examen oriente sur une famille de bactérie ou un genre bactérien, permettant d'adapter ou de modifier une antibiothérapie. En fonction du prélèvement ou du contexte clinique, il peut dans certains cas, en quelques minutes, identifier de façon quasi certaine un pathogène.

9. Examen microscopique après coloration

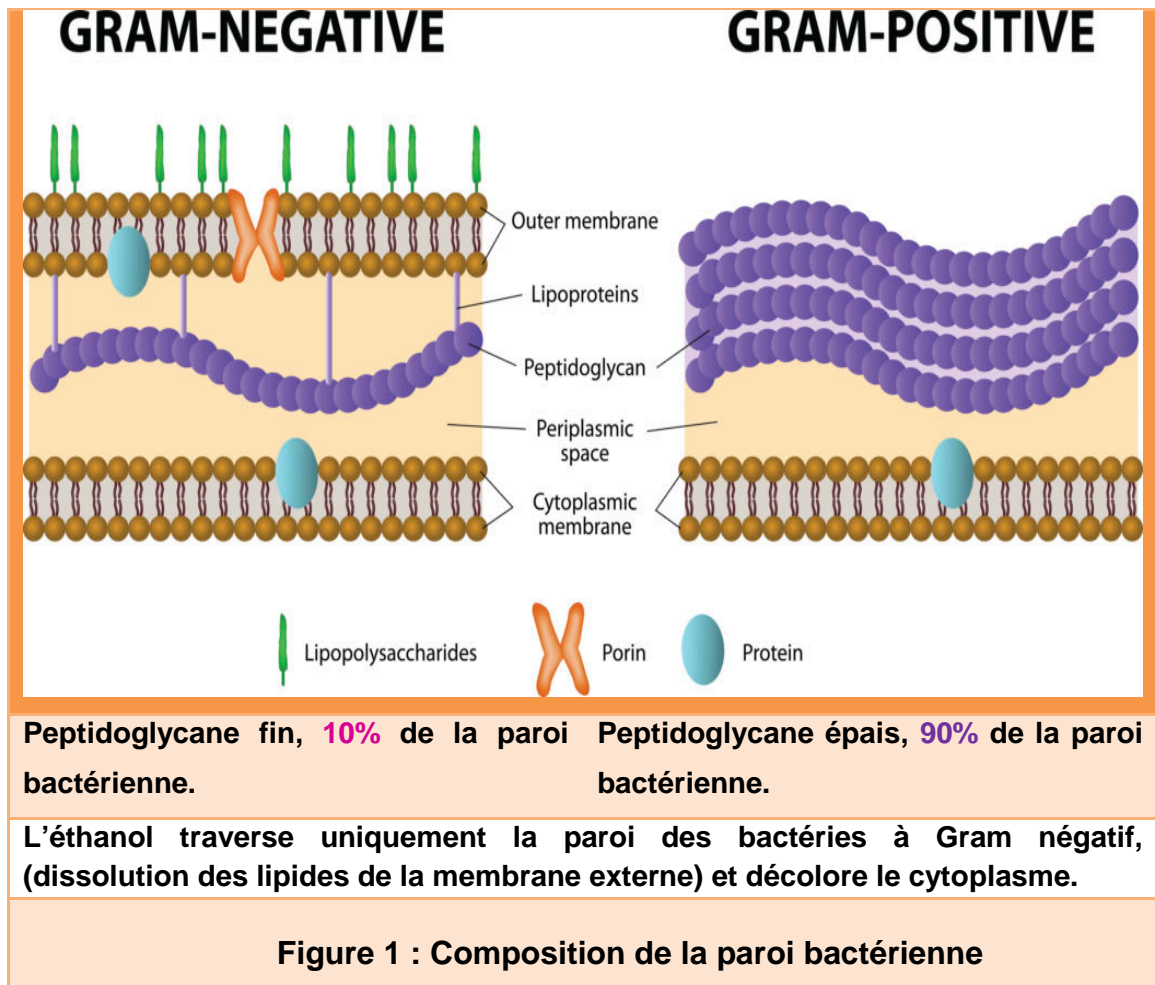
Les techniques les plus communément utilisées font appel à des colorations. La préparation est fixée sur une lame puis colorée. Plusieurs types de coloration existent :

- **Les colorations non différentielles** : anciennes, peu utilisées en pratique. Colorent toutes les bactéries sans distinction. Elles permettent de mieux visualiser les morphologies bactériennes et leur agencement. Exemple : coloration au bleu de méthylène.
- **Les colorations différentielles** : distinguent les bactéries en fonction de la structure de leur paroi. Deux colorations de référence sont employées : la coloration de Gram distinguant bactérie à Gram négatif et bactérie à Gram positif, et la coloration de Ziehl- Neelsen mettant en évidence les bacilles acido-alcool- résistants.

La coloration de Gram est la **coloration de référence en bactériologie**.

Développée en 1884 par un médecin danois, Christian GRAM. Elle est basée sur l'affinité tinctoriale différente des bactéries à certains colorants dues à la constitution de leur paroi. Cette coloration permet aussi d'observer la morphologie des bactéries (forme allongée pour les bacilles et arrondies pour les cocci).

Lorsque la coloration est effectuée à partir d'un produit pathologique contenant des cellules ou des leucocytes, la coloration des noyaux de ces cellules doit apparaître violette et le cytoplasme rose. **(6, 7)**



III. METHODOLOGIE

1. Détermination de la portée flexible

La coloration de Gram en méthode manuelle ou automatisée sur le système RAL Stainer® (RAL DIAGNOSTICS) est normalisée, elle s'inscrit dans une **portée A de type qualitatif. (8)**

Il s'agit d'une vérification rétrospective des performances d'une méthode déjà utilisée, pour s'assurer que les performances annoncées et souhaitées sont atteintes dans les conditions de travail de notre laboratoire.

Des recommandations sur le choix des critères de performances sont établies dans le **SH GT 04 (9)** et figurent dans le **tableau 1**.

Paramètre à vérifier et/ou à connaître	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A
Spécificité analytique	Oui	Non
Sensibilité diagnostic	Oui	Non
Contamination entre échantillon	Oui	Oui
Stabilité des réactifs (après ouverture, embarqués)	Oui	Non
Robustesse	Oui	Non
Comparaison avec méthode de référence	Oui	Non
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire	Oui (si existe)	Oui si possible

Tableau 1 : Recommandation sur la vérification/ validation d'une méthode d'analyse qualitative selon le SH GTA 04

D'après ces recommandations, on voit que la vérification bibliographique critique prend toute son importance. Elle est réalisée à l'aide de documents pertinents : recommandations du Référentiel en Microbiologie Médicale (REMIC version 2015), QUAMIC 2016, documentation fournisseur et bibliographie Pubmed.

Le cycle PDCA (roue de Deming) représentée ci-dessous, l'analyse des risques à l'aide du diagramme d'Ishikawa (5M) ont permis l'organisation de ce travail.

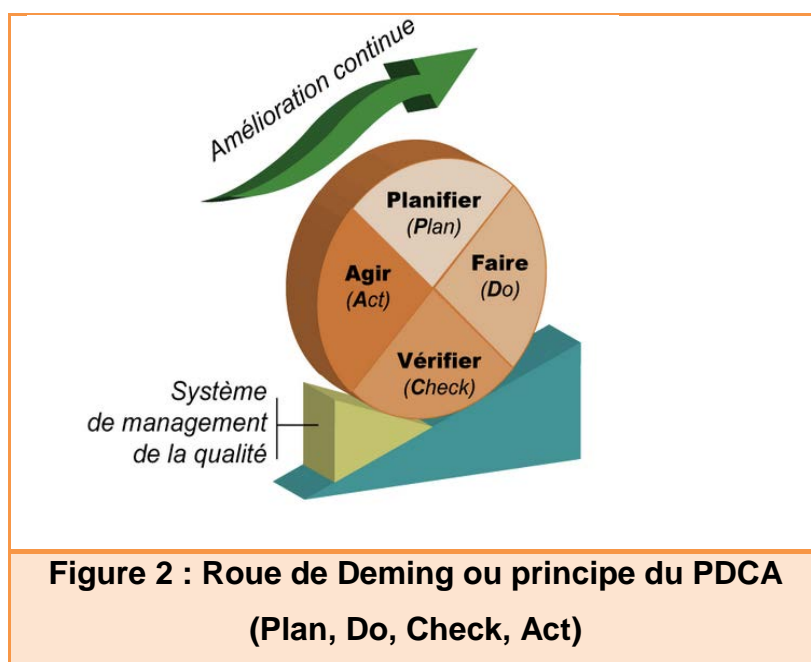


Figure 2 : Roue de Deming ou principe du PDCA (Plan, Do, Check, Act)

La réalisation du projet se fera en plusieurs étapes selon le calendrier suivant :

	Etat des lieux : QQQQCP	
Etape 1	Description et choix de la méthode	PLAN
Etape 2	Rédaction MO et mise en place de CQI	DO
Etape 3	Analyse des risques	
Etape 4	Vérification performances	
Etape 5	Comparaison de méthode	
Etape 6	Résultat	CHECK
Etape 7	Interprétation & Rédaction du dossier de validation de méthode	ACT
Tableau 2 : calendrier de réalisation du projet		

Les étapes 6 et 7 feront l'objet d'un autre calendrier dont la réalisation dépendra de la nouvelle organisation du laboratoire depuis mon départ au mois de mai.

2. Etat des lieux

- ✚ **Quoi** : Répondre aux exigences normatives 15189 pour la réalisation en routine coloration de Gram manuelle/ automatisée sur le système RAL STAINER:
- ✚ **Qui** : un biologiste et un technicien référents de la coloration de Gram désignés (définition des actions à mener, révision bibliographique, participation à la rédaction de la documentation, formations, analyse des résultats).
- ✚ **Où** : Unité de bactériologie, J0 et paillasse de routine L1,L2,L3.
- ✚ **Quand** : de mai 2017 à novembre 2017.
- ✚ **Comment** :
 - Evaluation des besoins en matériel et réactifs : une check-list a été établie et figure dans le tableau ci-dessous (cf. annexe I)
 - Documentation :
Regrouper l'ensemble des documents de travail : normatifs, référentiels, bibliographiques et documents internes (MO et FO).

Etablir un bilan des documents techniques relatifs à la coloration de Gram à rédiger ou à actualiser.

- Etablir le bilan des formations –habilitations relatives à la réalisation de la coloration de Gram par les 2 techniques : manuelle et automatisée sur le système « RAL **Stainer®**».
- Analyse et maîtrise des risques.
- Vérification des performances
- Confirmation des performances en pratique quotidienne (en s'appuyant sur le guide technique abordant la gestion des contrôles qualité SH GTA 06) **(10)**.

Pourquoi :

Respect des exigences normatives (norme ISO 15189) pour maîtriser la technique de la coloration de Gram en pratique quotidienne dans notre laboratoire.

- Apporter certains éléments du dossier de vérification/ validation de méthode, selon le formulaire (SH FORM 43) qui pourra être soumis au COFRAC dans le cadre de l'accréditation.

3. Description et choix de la méthode

a. Coloration de Gram manuelle

Principe :

Le principe de la technique est le suivant : le cristal violet colore la paroi de toutes les bactéries en violet, le lugol est un mordant qui fixe le violet, l'alcool décolore, la fuschine colore en rose les bactéries décolorées par l'alcool. Ainsi, les bactéries Gram négatif sont colorées en rose et les bactéries Gram positif sont colorées en violet.

Méthode de mesure

Les lames pré étalées, séchées à l'air ou sur la platine chauffante puis fixées à l'alcool à 95° et laissées sécher à l'air, sont colorées manuellement à l'aide de réactifs prêts à l'emploi.

Les étapes sont décrites dans un MO spécifique à la réalisation de la coloration de Gram comme suite **(figure3)** :

- réaliser un frottis, le fixer à l'alcool à 95°
- recouvrir la lame de **violet de gentiane** : 1 minute ;
- rejeter le violet de gentiane ;
- recouvrir de **lugol** : 1 minute ;
- rejeter le lugol ;
- décolorer à l'**alcool à 95°**, la lame tenue inclinée (45°). La durée de décoloration à l'alcool est variable selon l'épaisseur du frottis. En pratique, la durée de décoloration est suffisante lorsque ce qui s'écoule en bas de la lame inclinée est devenu clair ;
- stopper la décoloration par un lavage à l'eau ;
- recouvrir la lame de **fuchine**, 30 secondes à une minute ;
- laver à l'eau ;
- sécher entre deux feuilles de papier filtre, ou sur la platine ;
- examiner au microscope optique, à l'immersion (objectif X 100)

Les étapes de fixation et de coloration doivent être réalisées sous une hotte en utilisant des gants à usage unique.

b. Coloration de Gram automatisée sur le système « RAL Stainer® »

Principe :

Les lames pré-étalées sont chargées à raison de 10 lames par porte-lames, qui est ensuite placé dans l'un des deux tiroirs de chargement (**figure 2**)

Un bras à mouvement circulaire et vertical :

- Accroche le porte-lames ainsi mis en place ;
- Amène le porte-lames dans chaque station de coloration puis dans la station de rinçage selon le protocole « Gram de Nicolle » : protocole pré-enregistré spécifique de la coloration de Gram ;
- Ramène le porte-lames en position initiale.

Les lames sont alors séchées. La coloration est terminée.

Méthode de mesure :

Automatisation de la coloration de Gram via un système de coloration par bain de lames pré étalées, permettant d'obtenir des résultats rapides et standardisés.

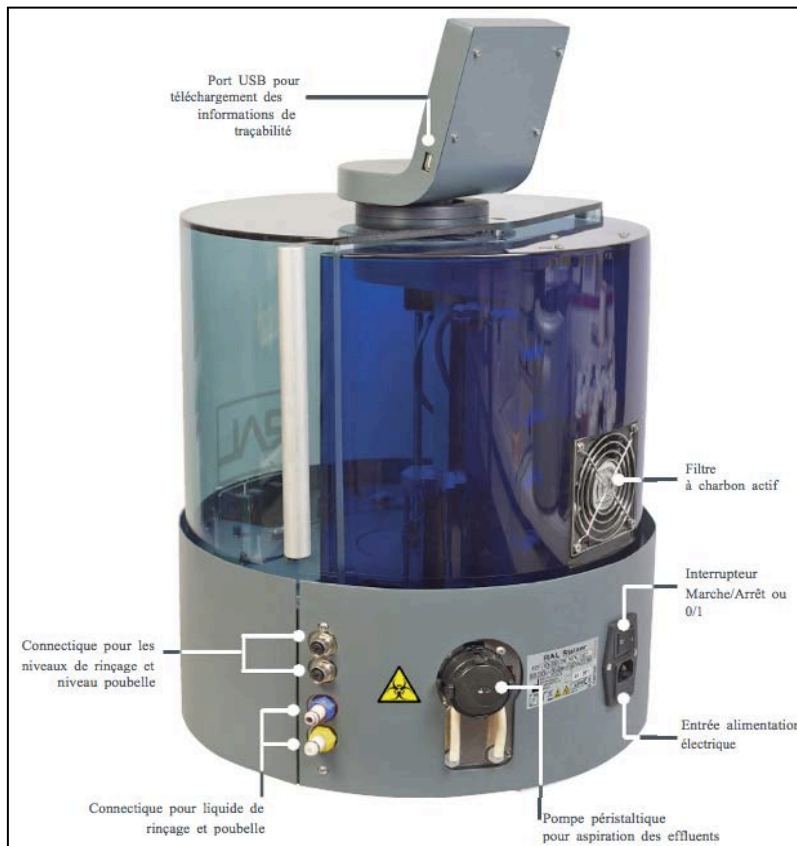
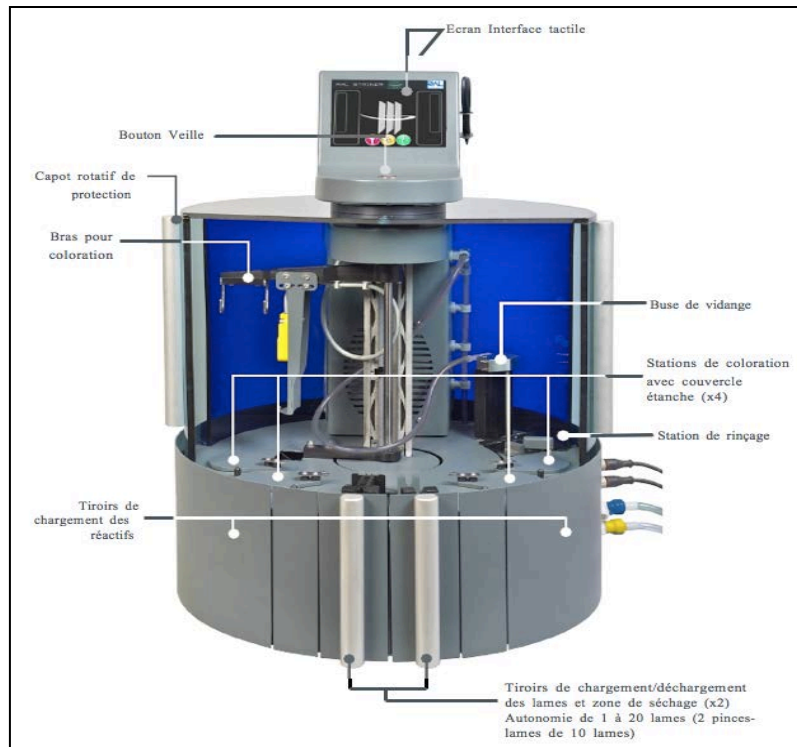
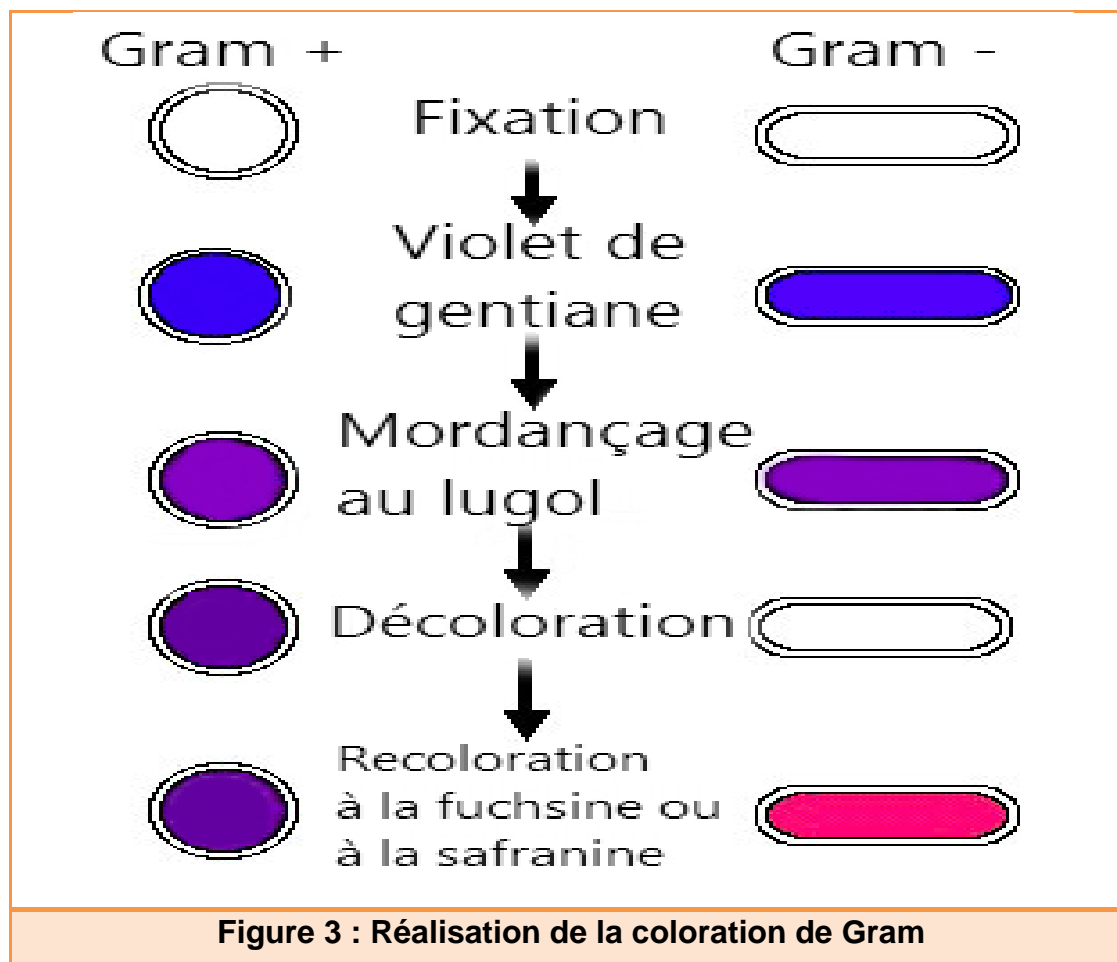


Figure 2 : Vue d'ensemble du colorateur RAL Stainer®



4. Rédaction des modes opératoires :

La rédaction et la modification des modes opératoires relatifs à la coloration de Gram est réalisée en collaboration avec la technicienne référente de la coloration de Gram.

Les modes opératoires et formulaires à rédiger sont :

- Mode opératoire de réalisation de la coloration de Gram
- Mode opératoire utilisation quotidienne du colorateur RAL Stainer®
- Mode opératoire de maintenance du colorateur RAL Stainer®
- Formulaire de maintenance du colorateur RAL Stainer®
- Mode opératoire gestion des pannes du colorateur RAL Stainer®
- Mode opératoire CQI/CQE à actualiser pour -y intégrer la coloration de Gram.

Une fois rédigés et approuvés, les documents sont inclus dans le système de gestion documentaire du laboratoire « **kalilab** », de manière à être accessible à l'ensemble du personnel du laboratoire

5. Mise en place de CQI

Le laboratoire dispose d'une collection de souches de référence parfaitement caractérisées, issues de collections de l'American Type Culture Collection (ATCC) ou de la Collection de l'Institut Pasteur (CIP) du CRBIP (centre de ressources biologiques de l'Institut Pasteur), ou collectées lors de l'évaluation externe de la qualité (ANSM, UKNEQAS,...). Ces souches ont été choisies pour évaluer les géloses, les tests utilisés pour les examens bactériologiques de routine et l'antibiogramme.

Un calendrier annuel de passage des contrôles de qualité internes (CQI) a été constitué afin que chaque paramètre soit évalué au minimum toutes les semaines.

Certaines de souches serviront au contrôle qualité et à l'évaluation des performances de la coloration de Gram par les deux techniques manuelle et automatisée.

a. Choix des matériaux de contrôle :

Pour réaliser l'évaluation des performances de la coloration de Gram ainsi que le contrôle de qualité des réactifs (CQI), le choix des souches de référence a tenu compte (**tableau 2**):

- d'une part des espèces les plus fréquemment rencontrées dans notre pratique courante (**E. coli** CIP 7624, **S. aureus** CIP 7625, **P. aeruginosa** ATCC 27853).

Nom de l'espèce	Code	morphologie	Milieu	Conditions d'incubation	Durée
Escherichia coli	CIP 7624	Bacille Gram Négatif	GS*	Aérobic 30°C	24h
Staphylococcus aureus	CIP 7625	Cocci Gram Positif	GS	Aérobic 37°C	24h
Pseudomonas aeruginosa	ATCC27853	Bacille Gram Négatif	GS	Aérobic 37°C	24h
Corynebacterium striatum	CIP 8115	Bacille Gram Positif	TSA**	Aérobic 37°C	24h
Streptococcus pneumoniae	CIP 104485	Cocci Gram négatif	GS	5% CO2 37°C	24h

(*)GS : gélose au sang frais, (**) TSA : gélose ordinaire

Tableau 2 : Caractéristiques des matériaux de contrôle utilisés pour l'évaluation des performances de la coloration de Gram

- de l'affinité tinctoriale variable de certaines bactéries à la coloration de Gram en intégrant une souche dite « Gram faible » ou « Gram variable »
(**C. striatum** CIP 8115, **S. pneumoniae** CIP 104485)

b. Rythme :

Colorateur RAL Stainer® :

Chaque semaine et à chaque changement de réactif, 2 souches de référence (une bactérie à Gram négatif (**E. coli** CIP 7624) et une bactérie à Gram positif (**S. aureus** CIP 7625) seront à colorer dans la même série, sur colorateur au J0 et par la méthode manuelle, dans chacun des 3 secteurs de bactériologie médicale : L1, L2 et L3, selon un calendrier défini dans le mode opératoire de Gestion des contrôle de qualité interne (HM-M-BACT-MT-ANA-042-v01).

c. Modalités techniques :

J0 :

- Mise en culture des souches
- Création de l'analyse dans le SGL « GLIMS » (à J0), une feuille de paillasse Scan –résultat est éditée. Elle est spécifique de chaque souche et détaille les tests à effectuer.

J1 :

- Réalisation des lames de contrôle.
- Réalisation de la coloration de Gram manuelle et automatisée sur le RAL Stainer (ainsi que les tests utilisés en routine).
- Lecture de la coloration de Gram par un technicien **et** par un biologiste qui reporte son nom sur la fiche de traçabilité.
- Remplissage et archivage des résultats.

d. Conduite à tenir en cas de CQI non conforme

Décrite dans le mode opératoire correspondant à la gestion des CQI. Elle comporte une analyse des causes, elle aboutit à l'identification de la cause suspectée.

Une action corrective est mise en place, elle dépend de la nature de la cause identifiée. (Problème de réactif, automate, manipulateur...)

Dans tous les cas, la coloration de Gram est refaite.

Une fiche de non-conformité est ainsi remplie.

Une analyse d'impact sur les résultats patients depuis le dernier contrôle conforme est à réaliser aussi.

6. Analyse et maîtrise des risques

a. Etude des risques

L'étude des risques est décisive, elle doit aboutir à l'identification des risques pour la mise en place de moyens cohérents de maîtrise adaptés à notre propre pratique. Les facteurs de risque sont identifiés et classés selon la méthode des 5M ou diagramme d'Ishikawa.

a. Criticité des réactifs

Selon une approche **AMDEC**

La non maîtrise de l'étape de décoloration, entraîne une mauvaise coloration pouvant avoir une incidence à la fois sur le diagnostic et le traitement. La gravité est donc importante « 3 ».

La fréquence est estimée à 2 avec la technique automatisée et à 3 avec la technique manuelle.

La détectabilité est estimée à 2 avec la technique automatisée, 3 avec la technique manuelle.

L'indice de criticité des réactifs (risque de décoloration) est de 12 pour la méthode automatisée, 18 pour la méthode manuelle.

Ceci explique un choix de rythme de CQI comme suite **(10)** :

- Lors de chaque changement de réactifs et une fois par semaine, en utilisant 2 souches de référence (une bactérie à Gram négatif (**E. coli** CIP 7624) et une bactérie à Gram positif (**S. aureus** CIP 7625)).
- Une lame avec BGN à chaque Gram manuel.

c. Maitrise des risques

Pour les points critiques identifiés les éléments à maîtriser sont spécifiés et les moyens de maîtrise à mettre en œuvre sont présentés dans les tableaux suivants classés par élément d'association 5 M : **(11)**

Elément d'association 5M : **MATIERE**

Risques	Points critiques à maitriser	Modalités de maitrises
Allongement des délais de rendu des résultats, augmentation du risque patient : échantillon primaire non conforme (modalités de prélèvement, récipients, délais de transport...)	Qualité de l'échantillon : Conditions de prélèvement et d'acheminement des prélèvements bactériologiques (sang, LCR, urines, Selles, prélèvements pulmonaires ...)	Manuel de prélèvement et catalogue des examens. Vérification à la réception. Transport et réception des examens de biologie.
Rendu de résultats erronés : altération des milieux de culture, mauvais isolement des souches pathogène	Contamination des milieux de culture lors de l'ensemencement à J0 Conservation des géloses	Respect de la documentation interne Formation et information du personnel Conditions de conservation conformes aux recommandations fournisseur. Test de fertilité (souche de contrôle) Métrologie des enceintes de stockage des réactifs et surveillance des températures
Absence de réactifs ou réactifs périmés ou altéré : allongement des délais de rendu des résultats, augmentation du risque patient : mauvaise orientation pour l'identification et l'antibiogramme	Gestion des commandes Respect des conditions de conservation des réactifs (température, humidité)	Procédure de gestion des commandes Vérification à réception de la date de péremption à l'installation Certificats de conformité Maitrise des conditions ambiantes et système de surveillance des températures

Type d'échantillon : il peut s'agir d'échantillon primaire = prélèvements bactériologiques (sang, LCR, Urines, prélèvements pulmonaires....) ou de cultures.

Il importe que la phase pré-analytique soit maîtrisée avec l'existence d'une procédure sur les conditions de prélèvement, d'acheminement, précisant les délais de transport et de réception.

Réactifs : Kit RAL Stainer® Gram-Nicolle prêt à l'emploi, introduit directement dans l'automate (autonomie de 1 -20 lames). Condition de conservation et de stockage définies par le finisseur, respectées et racées.

Élément d'association 5M : METHODE

Prétraitement de l'échantillon : le point critique à maîtriser est **le pré étalement des lames**, car il conditionne à la fois la coloration et la lisibilité de la lecture. Il doit être réalisé de façon à obtenir un frottis mince (étalement de manière circulaire d'une goutte d'échantillon déposée sur une lame).Ce point est décrit dans les modes opératoires correspondants à la coloration de Gram manuelle et l'utilisation du colorateur RAL stainer.

Risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrises
Rendu de résultats erronés : ensemencement non-conforme	Choix des milieux de culture Qualité de l'ensemencement	Connaissance et respect de la documentation interne (MO) Fiches techniques du fournisseur disponible au poste /Kalilab Compétence du personnel : formation et information Résultats des contrôles de qualité internes
Coloration non homogène, difficile à lire : Difficulté d'interprétation, allongement des délais de rendu des résultats, augmentation du risque patient.	Pré-étalement des lames	
Lecture du Gram difficile : difficulté d'interprétation Allongement des délais de rendu des résultats, augmentation du risque patient Rendu de résultats non-valides	Technique de coloration « Etape décoloration »	

Etape de décoloration : étape critique, dépend de l'épaisseur du frottis (étape pré étalement). En pratique, la durée de décoloration est suffisante lorsque ce qui s'écoule en bas de la lame inclinée est devenu clair.

Elément d'association 5M : MAIN D'ŒUVRE

La **compétence de l'utilisateur est un point crucial à maîtriser**, surtout pour la méthode manuelle. L'étape de décoloration est particulièrement décisive, nécessitant ainsi une harmonisation et une évaluation des pratiques, elle est intégrée dans les fiches de poste. Le maintien en continu des compétences par la réalisation des CQI

Cette compétence est évaluée après formation et aboutie à l'habilitation du personnel.

Risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrises
<p>Rendu de résultats erronés : mauvais pré-étalement des lames, technique de coloration incorrecte, méconnaissance du fonctionnement et de la maintenance du colorateur, mauvaise lecture du Gram, mauvaise gestion des CQI</p>	<p>Compétence du personnel Gestion des non conformités liées a des erreurs de manipulation ou erreurs technique</p>	<p>Fiche de poste Formation initiale et continue Formation à l'utilisation du colorateur Evaluation et habilitation Maintien des compétences Connaissance et respect des MO et procédures internes Résultats des CQI et CQE Traçabilité Déclaration et traitement des non conformités Révision régulière des non conformités</p> <p>Documents associés : Procédure de Gestion des ressources humaines du personnel médical et non médical, Fiche d'habilitation, MO réalisation de la coloration de Gram, MO utilisation et maintenance du colorateur RAL Stainer, Fiche d'habilitation, fiche de fonction, MO : EEQ et CIQ. Gestion des non conformités,</p>

Les modes opératoires correspondant à la réalisation de la coloration de Gram et à l'utilisation du colorateur disponibles dans le système documentaire (Kalilab), sont connus de tous, la prise de connaissance de ces documents sera tracée.

Elément d'association 5M : MILIEU

Risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrises
Non respect des conditions ambiantes requises	T° de fonctionnement 18 à 30°c Humidité 20% à 85% Eclairage	Climatisation de la pièce Surveillance des conditions environnementales (T°, hygrométrie) SIRIUS Organisation des locaux, post technique lumineux Documentation associée : Procédure surveillance des installations et des conditions ambiantes Guide de
Rendu de résultats erronés : mauvais isolement des souches pathogènes, non respect des conditions de santé et de sécurité du personnel de laboratoire.	Contamination des milieux de culture lors de l'ensemencement à j0, Protection de l'opérateur	Travail sous PSM, hotte chimique Maintenance annuelle du PSM, Bio nettoyage des paillasse et contrôles de surface, Application des procédures standards, Organisation des locaux Documentation associée : Instruction bionettoyage des surfaces Procédure Hygiène, Sécurité et Entretien de l'environnement de travail Procédure Gestion des déchets

Les conditions ambiantes requises (T° et hygrométrie...) précisée dans les fiches techniques des fabricants des réactifs et de l'automate. La température requise est

comprise entre 18 à 30°C pour le colorateur Ral Stainer® et entre 18 et 25°C pour la coloration manuelle.

Elément d'association 5M : **MATERIEL**

Risques	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrises
<p>Rendu de résultats erronés : technique de coloration incorrecte mauvais isolement des souches pathogènes</p> <p>Difficulté d'interprétation : lecture du Gram difficile</p>	<p>Maintenance: Intégrité du matériel de lecture : microscope</p> <p>Contamination des milieux ensemencés par le matériel d'ensemencement (oese, pipette)</p>	<p>Climatisation de la pièce Surveillance des conditions environnementales (T°, hygrométrie) SIRIUS</p> <p>Organisation des locaux, post technique lumineux</p> <p>Documentation associée : Procédure surveillance des installations et des conditions ambiantes Guide de</p>

7. Vérification des performances

Sur site, l'étude des performances va consister à :

- évaluer la contamination entre échantillons
- comparer la coloration manuelle versus la coloration automatisée sur système RAL Stainer

Les critères d'acceptabilité ont porté sur la coloration (Gram positif, Gram négatif) et la morphologie observée (bacille ou cocci) de souches de référence connues de la Collection de l'Institut Pasteur.

a. Contamination

Les phénomènes de contamination peuvent affecter :

- les échantillons à analyser, lorsque plusieurs sont analysés simultanément (contamination inter- échantillons)
- ou les réactifs (contamination inter- réactifs).

a.1 Protocole expérimental

L'absence de contamination croisée de la coloration de Gram sera évaluée par un même technicien, dans une même série de coloration de lames de contrôles (9).

- lames de contrôle positives (**P1**) de souche de référence Gram négatif :
E. coli CIP 7624 ;
- lames de contrôle positives (**P2**) de souche de référence Gram positif :
S. aureus CIP 7625 ;
- lames blanches (négatives) (**N**) réalisées en déposant au centre d'une lame, 20 uL d'eau stérile.

Le bac de coloration sera chargé d'une même série de 12 lames de manière à alterner les échantillons positifs (Gram positif, Gram négatif) et négatifs selon la séquence suivante : **P1NP2 P1NP2 P1NP2 P1NP2**.

Nb : le bac de coloration ne permet pas de réaliser plus de 12 colorations de Gram manuelles simultanées.

En méthode automatisée, chaque pince-lames sera chargé selon la même séquence, à raison de 10 lames par pince-lames : **P1NP2 P1NP2 P1NP2 N**.

a.2 Critères d'acceptabilité :

La lecture des lames se fait au microscope à l'immersion (X1000).

Les lames de contrôles d'**E. coli** (P1) doivent fournir une coloration et une morphologie de bacille à gram négatif (BGN)

Les lames de contrôles de **S. aureus** (P2) doivent fournir une coloration et une morphologie de cocci à gram positif (CGP).

Les lames de contrôles négatives (N) ne doivent fournir aucune coloration.

Les résultats de chaque lecture seront notés, sous forme de tableau. (cf. annexe N°II)

b. Comparaison de méthode

Les performances de la coloration sur le colorateur RAL Stainer seront comparées aux performances de la coloration de Gram manuelle.

b.1 Protocole expérimental

La corrélation entre les 2 techniques est évaluée, en **passant en parallèle**, par le même technicien, des lames d'échantillons, préparées en double, dans les mêmes conditions opératoires :

- **sur le colorateur RAL Stainer®**
- **et en coloration manuelle**

b.2 Echantillonnage

Il faudra des bactéries à coloration de Gram positif et Gram négatif, de morphologie variée, cocci et bacilles :

- **Lames de contrôles** : 5 lames de chacune des 5 souches de référence suivantes : E. coli, S. aureus, S. pneumoniae, P. aeruginosa, C. striatum. Ce qui permettra d'avoir des échantillons variés, représentatifs et le plus possibles similaires entre les deux méthodes (diminuer l'impact du pré étalement).
- **Prélèvements de patients** : 10 lames à partir d'échantillons primaires (urines, prélèvements respiratoires, et 10 lames à partir de subcultures bactériennes (hémocultures), représentatifs de la population de patients rencontrés en pratique courante.

b.3 Critères d'acceptabilité

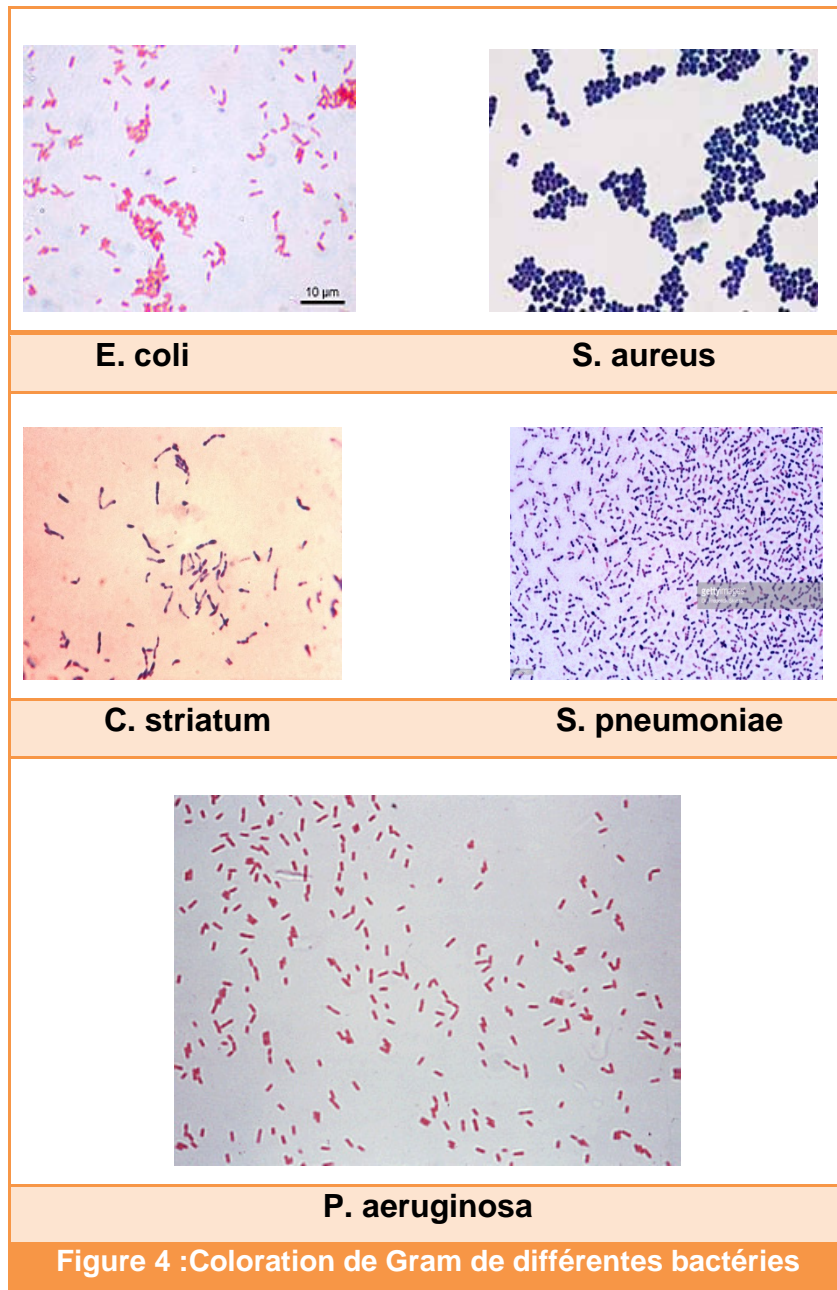
La lecture des lames se fait au microscope à l'immersion (X1000).

- ✚ Bacille rose à rouge (coloration bipolaire) pour **E. coli** ;
- ✚ Bacilles en massue violets pour **C. striatum** ;
- ✚ Cocci en amas violets pour le **S.aureus** ;
- ✚ Cocci en diplocoque et en chaînettes violets pour **S. pneumoniae** ;
- ✚ Bacilles fins roses pour **P. aeruginosa**.

Les résultats de chaque lecture seront notés dans un tableau. (cf. annexe N° III)

Le % de discordance entre les deux techniques à ne pas dépasser sera fixé à 90%

En cas de discordance entre les deux méthodes, une analyse pour l'interprétation et la justification de l'écart sera réalisée.



8. Confirmation des performances en pratique quotidienne

L'utilisation, la gestion et le suivi de CIQ et EEQ permettront de repérer rapidement toute anomalie et de mettre en place des actions correctives immédiates. Le laboratoire est abonné à des compagnes d'EEQ avec une fréquence de passage de 4 fois dans l'année.

EEQ faisant appel à la coloration de Gram dans le cadre d'une identification bactérienne (CTBC, ANSM).

Ils permettent ainsi le suivi de la méthode mais aussi des utilisateurs et le maintien des compétences.

CONCLUSION

L'objectif de la vérification sur site/ validation des méthodes en biologie médicale est une garantie d'obtenir des résultats fiables pour les patients et les cliniciens dans l'environnement propre du laboratoire.

Ce travail décrit une méthodologie à suivre, pour la vérification de performance de la de la coloration de Gram, dans les conditions de travail de notre laboratoire.

La compétence de l'utilisateur est un point crucial à maîtriser, le biologiste doit aussi pleinement s'impliquer.

L'analyse des risques est décisive, elle nous permet de mettre en place des moyens cohérents de maîtrise, adaptés à notre propre pratique.

La vérification continue des performances vient compléter cette démarche, assurée par un programme judicieux de CQI associé à la participation à des compagnes d'EEQ. Elle permet le suivi de la méthode, mais aussi des utilisateurs et le maintien des compétences

ANNEXES

Annexe N°I : Tableau N°3 : Ttableau résumé : matériel et réactifs

Annexe N°II : Tableau N°4 : Etude de la contamination inter échantillon de la coloration de Gram

Annexe N°III : Tableau N° 5: comparaison de méthode : coloration de Gram automatisée sur le système RAL Stainer versus coloration manuelle

Annexe N°1

Produit	Description – Emplacement
<p>Coloration de Gram automatisée</p> <p>Kit RAL Stainer Gram Nicolle</p> <p>Colorateur RAL Stainer</p> <p>Coloration de Gram technique manuelle :</p> <p>Violet de gentiane phéniqué</p> <p>Liquide de lugol</p> <p>Fuchsine diluée au 1/10^{ème}</p> <p>Alcool 95°</p> <p>Eau distillée</p> <p>Lames avec plage dépolie</p> <p>Lamelles</p> <p>Oses à usage unique</p> <p>Gant à usage uniques</p> <p>Huile à immersion</p>	<p>Pièce J0</p> <p>Pièce J0 et réserve</p> <p>J0</p> <p>J0, L1, L2, L3</p> <p>Reserve du laboratoire</p> <p>réactifs RAL Diagnostics</p>
<p>PSM</p> <p>Hotte chimique</p> <p>Microscopes optique</p> <p>Platine chauffante</p>	<p>Pièces J0, L1, L2, L3</p> <p>Pièces J0, L1, L2, L3</p> <p>Paillasse J0, L1, L2, L3</p> <p>Paillasse J0, L1, L2, L3</p>
<p>Tableau N° 3 Tableau résumé : matériel et réactifs</p>	

Annexe N°II:

Opérateur :		Date :	
Contrôle	Critère d'acceptabilité	Résultat	
Lame E.coli 1	Bacille Gram négatif	Conforme ;	Non conforme ;
Lame blanche 1	Absence de microorganisme	Conforme ;	Non conforme ;
Lame S.aureus 1	Cocci Gréam positif	Conforme ;	Non conforme ;
Lame E. coli 2	Bacille Gram négatif	Conforme ;	Non conforme ;
Lame blanche 2	Absence de microorganisme	Conforme ;	Non conforme ;
Lame S.aureus 2	Cocci Gréam positif	Conforme ;	Non conforme ;
Lame E. coli 3	Bacille Gram négatif	Conforme ;	Non conforme ;
Lame blanche 3	Absence de microorganisme	Conforme ;	Non conforme ;
Lame S. aureus 3	Cocci Gréam positif	Conforme ;	Non conforme ;
Lame E. coli 4	Bacille Gram négatif	Conforme ;	Non conforme ;
Lame blanche 4	Absence de microorganisme	Conforme ;	Non conforme ;
Lame S. aureus 4	Cocci Gréam positif	Conforme ;	Non conforme ;
Coloration manuelle ;		Visa du biologiste :	
Coloration automatisée ;			
Conforme ;			
Non conforme ;			
Conclusion : Absence de contamination inter échantillon			
Tableau N° 4: Etude de la contamination inter échantillon de la coloration de Gram			

Annexe N° III :

Date :		Opérateur :			
Méthode	E.coli	S.aureus	C.striatum	P.aeruginopsa	S. pneumoniae
Coloration automatisée	Lame 1	Lame 1	Lame 1	Lame 1	Lame 1
	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;
	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;
	Lame 2	Lame2	Lame 2	Lame 2	Lame 2
	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;
	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;
	Lame 3	Lame 3	Lame 3	Lame 3	Lame 3
	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;
	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;
	Lame 4	Lame 4	Lame 4	Lame 4	Lame 4
Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	
Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	
Lame 5	Lame 5	Lame 5	Lame 5	Lame 5	
Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	
Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	
Coloration manuelle	Lame 1	Lame 1	Lame 1	Lame 1	Lame 1
	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;
	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;
	Lame 2	Lame 2	Lame 2	Lame 2	Lame 2
	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;
	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;
	Lame 3	Lame 3	Lame 3	Lame 3	Lame 3
	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;
	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;
	Lame 4	Lame 4	Lame 4	Lame 4	Lame 4
Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	
Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	
Lame 5	Lame 5	Lame 5	Lame 5	Lame 5	
Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	Conforme ;	
Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	Non conforme;	

Tableau N°5 : Comparaison de méthode :

Coloration de Gram automatisée sur le système RAL Stainer versus coloration manuelle

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Ordonnance N° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.
Journal Officiel de la République Française n°0012, [s.l.], 15 janvier 2010.
- 2- Loi N° 2013-442 du 30 mai 2013
- 3- Norme ISO EN 15189 « Laboratoires d'analyses de biologie médicale – exigences particulières concernant la qualité et la compétence ». AFNOR, [s.l.], décembre 2012.
- 4- L'article 147 de la loi 2016-1691 du 9 décembre 2016 - loi Sapin 2
- 5- L'accréditation en bactériologie : enjeux, difficultés et particularités. P. Laudat et al. Revue Francophone Des laboratoires-Avril 2014- N°461
- 6- Du prélèvement à la caractérisation des souches, P Lanotte, C Isnard et al, Bactériologie médicale, Elsevier Masson, 2016, p.15-43.
- 7- Référentiel en microbiologie médicale (REMIC), 5ème édition, 2015
- 8- Document Cofrac, **SH REF 08** : Expression et évaluation des portées d'accréditation ; Révision 05 Mars 2016.
- 9- Document Cofrac, **SH GTA 04** : guide technique d'accréditation de vérification (portée A/ validation (portéeB) des méthodes en biologie médicale ; Révision 01 Avril 2015.
- 10-Document Cofrac, **SH GTA 06**: Guide Technique d'accréditation: contrôle de qualité en biologie médicale. Révision 00 Juin 2012.
- 11-L'analyse des risques a priori en bactériologie, C. Naudin, revue française des laboratoires, Elsevier Masson SAS, Avril 2014, N° 461, p. 31-36.
- 12-QUAMIC : Recommandations 2016. Comité Qualité de la Société Française de Microbiologie.

Résumé :

La coloration de Gram est une étape incontournable mais aussi critique en bactériologie. Elle contribue au diagnostic clinique et à l'orientation thérapeutique.

Qui n'a pas hésité en lisant un Gram d'une hémoculture ? Qui ne s'est pas trompé dans ce diagnostic ?

Ce travail décrit une méthodologie à suivre, pour la vérification des performances de la coloration de Gram conformément aux exigences de la norme ISO 15189.

L'analyse des risques est décisive, elle nous permet de mettre en place des moyens cohérents de maîtrise, adaptés à notre propre pratique.

La compétence de l'utilisateur est un point crucial à maîtriser, le biologiste doit aussi pleinement s'impliquer.

Sur site, l'étude des performances va consister à évaluer la contamination entre échantillons (n=12 pour bac de coloration manuelle, n= 10 lames par porte-lames sur colorateur **RAL Stainer®**) et à comparer la coloration manuelle versus la coloration automatisée sur le colorateur **RAL Stainer®** de RAL Diagnostics, sur 25 échantillons de contrôles de souches de référence et 20 prélèvements de patients). Les critères d'acceptabilité portent sur la coloration (Gram positif, Gram négatif) et la morphologie (bacille ou cocci) observées au microscope à l'immersion (X 1000).

La vérification continue des performances viendra compléter cette démarche, assurée par un programme judicieux de CQI associé à la participation à des campagnes d'EEQ. Elle permet le suivi de la méthode, mais aussi des utilisateurs et le maintien des compétences.