



VERIFICATION DES PERFORMANCES DE LA COLORATION DE GRAM : APPROCHE METHODOLOGIQUE

**MÉMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITE AU LABORATOIRE
DE BIOLOGIE MEDICALE »**

Octobre 2017

Sonia LAOUIRA- CHERAIT

Biologiste- CHU Henri Mondor Créteil



Introduction

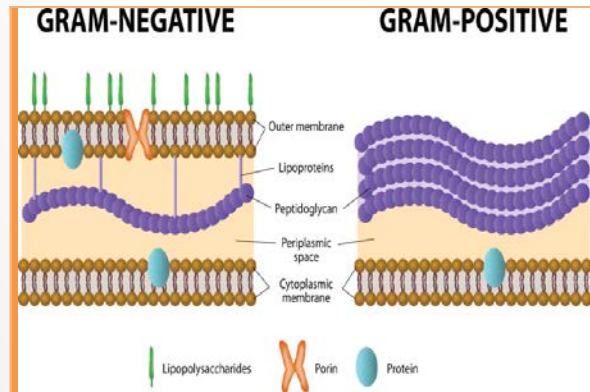
L'accréditation en Bactériologie

Coloration de Gram: Coloration de référence en bactériologie : 80% des prélèvements

Technique: Manuelle ou automatisée sur colorateur **RAL Stainer®**

Principe: coloration différentielle, basée sur l'affinité tinctoriale différente à certains colorants, due à la constitution de la paroi bactérienne.

- Le cristal violet colore la paroi de toutes les bactéries en violet;
- le lugol (mordant) fixe le violet;
- l'alcool décolore;
- la fuschine colore en rose les bactéries décolorées par l'alcool.
 - ❖ les bactéries **Gram négatif** sont colorées en rose
 - ❖ les bactéries **Gram positif** sont colorées en violet



Peptidoglycane fin, 10% de la paroi bactérienne. Peptidoglycane épais, 90% de la paroi bactérienne.

L'éthanol traverse uniquement la paroi des bactéries à Gram négatif, (dissolution des lipides de la membrane externe) et décolore le cytoplasme.

Figure 1 : Composition de la paroi bactérienne

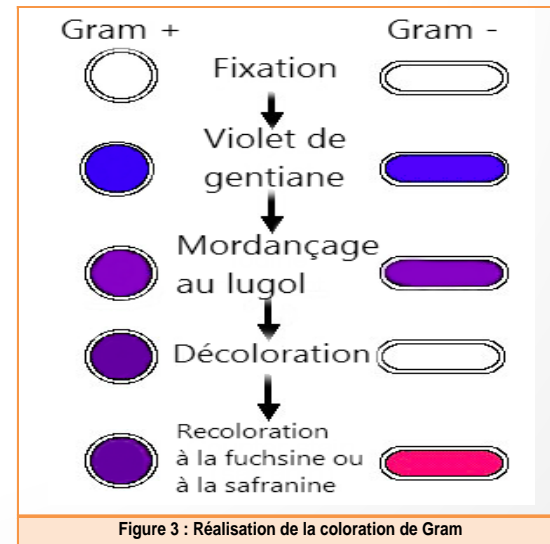
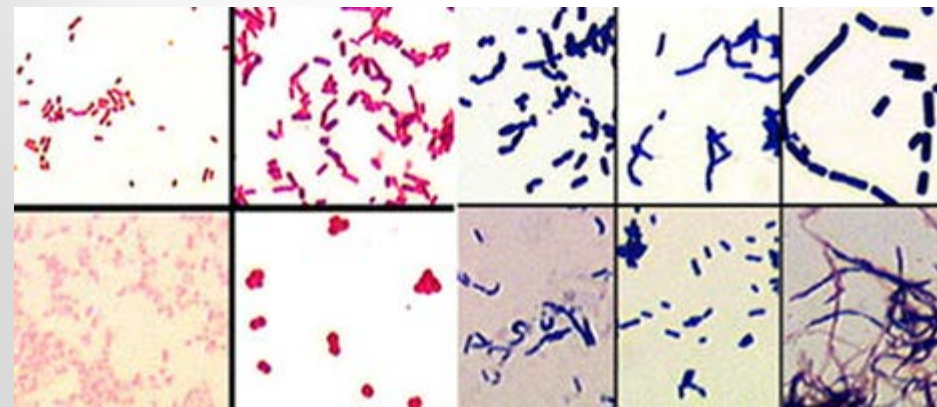


Figure 3 : Réalisation de la coloration de Gram

Pourquoi ce travail?



- **Obligation réglementaire:** calendrier imposé par le COFRAC
- 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
- Obtenir des éléments du **dossier de vérification des performances (portée A)** (SH FORM 43)



Démarche utilisée

- PDCA** (roue de Deming)

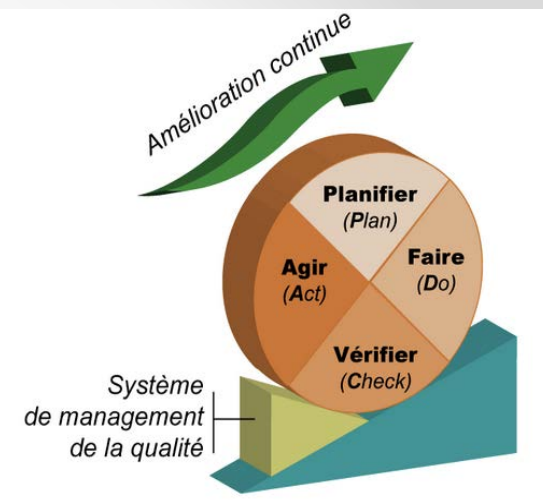
Etape 1	Etat des lieux : QOQCP Description et choix de la méthode	PLAN
Etape 2	Rédaction MO et mise en place de CQI	DO
Etape 3	Analyse des risques	
Etape 4	Vérification performances	
Etape 5	Comparaison de méthode	
Etape 6	Résultat	CHECK
Etape 7	Interprétation & Rédaction du dossier de validation de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

- Analyse des risques:** (5M) diagramme d'Ishikawa

- Portée flexible:** Portée A de type qualitatif

- ✓ Vérifier, de manière rétrospective, les performances d'une méthode déjà utilisée.
- ✓ S'assurer que les performances annoncées et souhaitées sont atteintes dans les conditions de travail du laboratoire.



Synthèse du mémoire: Etat des lieux

- Définir les référents de la coloration de Gram: un biologiste + 1 technicien
- Définir les besoins en matériels et en réactifs
- Établir un bilan « documentation »: fait, à faire, à modifier
- Réaliser le bilan des formations – habilitations du personnel: y inclure les étapes critique de la coloration de Gram,
- Bilan des contrôles de qualité déjà existants pour y inclure l'étape de coloration de Gram

Synthèse du mémoire: Mise en place de CQI

- **Choix des matériaux de référence: Tenir compte:**
 - des espèces les plus fréquemment rencontrées dans notre pratique courante (*E. coli* CIP 7624, *S. aureus* CIP 7625, *P. aeruginosa* ATCC 27853).
 - de l'affinité tinctoriale variable de certaines bactéries à la coloration de Gram: intégrer une souche dite « Gram faible » ou « Gram variable » (*C. striatum* CIP 8115, *S. pneumoniae* CIP 104485).
- **Rythme:**
 - Chaque semaine et à chaque changement de réactif, après maintenance colorateur.
 - une bactérie à Gram négatif (*E. coli* CIP 7624) + une bactérie à Gram positif (*S. aureus* CIP 7625).
 - A colorer dans la même série, sur colorateur au J0 + méthode manuelle, dans chacun des 3 secteurs de routine, selon un calendrier pré défini.

Synthèse du mémoire: Analyse et maîtrise des risques

- **Maitriser le pré traitement de l'échantillon:**

Pré étalement de l'échantillon (épaisseur du frottis): conditionne la coloration et la lisibilité,

- **Maitriser l'étape de décoloration:**

Dépond de l'épaisseur du frottis

- **Compétence opérateur +++**



Synthèse du mémoire

Vérification des performances(1)

- **Contamination inter-échantillons**

Évaluer par un même technicien, dans une même série de coloration de lames de contrôles

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

Alterner les échantillons positifs et négatifs (**P1NP2 P1NP2 P1NP2 P1NP2**)

- Une série de 12 lames en coloration manuelle
- Une série de 20 lames (10 lames par pince-lames) sur colorateur **RAL Stainer®**

Lire au microscope optique à l'immersion (X1000).

- Les lames de contrôles d'*E. coli* (P1) doivent fournir une coloration et une morphologie de BGN
- Les lames de contrôles de *S. aureus* (P2) doivent fournir une coloration et une morphologie de CGP
- Les lames de contrôles négatives (N) ne doivent fournir aucune coloration.

Noter les résultats sous forme de tableau

Synthèse du mémoire

Vérification des performances (2)

- **Comparaison de méthode**

Passer en parallèle par le même technicien des lames d'échantillons, préparées en double, dans les mêmes conditions opératoires :

- sur le colorateur RAL Stainer®
- en coloration manuelle

Échantillons:

- **Lames de contrôles souches ATCC :**

(échantillons variés et représentatifs , le plus possibles similaires entre les deux méthodes diminuer l'impact du pré étalement).

- **Prélèvements de patients primaires et de subcultures :**

(représentatifs de la population de patients rencontrés en pratique courante)

Lire les lames au microscope à l'immersion (X1000)

Synthèse du mémoire: Confirmation des performances

CQI

Abonnement à des campagnes d'EEQ avec une fréquence de passage de 4 fois dans l'année.

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

L'utilisation, la gestion et le suivi des CIQ - EEQ permettront de:

- repérer rapidement les anomalies
- mettre en place des actions correctives immédiates
- Suivre la méthode
- maintenir les compétences

Difficultés et limites



- Dégager du temps pour le projet
- Vérification initiale du colorateur **RAL Stainer**® réalisée par une technicienne ne travaillant plus dans le laboratoire
- Difficulté à poursuivre le projet après mon départ du service de bactériologie

Conclusion



Ce travail:

- décrit une méthodologie à suivre, pour la vérification de performance de la coloration de Gram, dans les conditions de travail du laboratoire.
- apporte certains éléments du **dossier de vérification des performances (SH FORM 43)**.

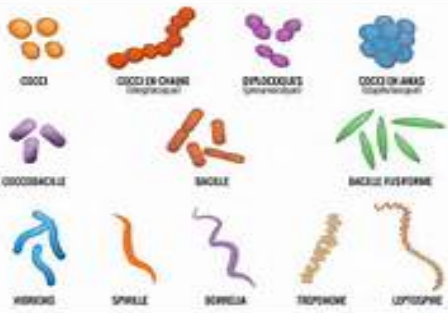
L'**analyse des risques** est décisive, elle permet de mettre en place des moyens de maitrises cohérents et adaptés.

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

La **vérification continue** des performances vient compléter cette démarche:

- assurée par un programme judicieux de CQI
- associé à la participation à des campagnes d'EEQ.
- permet le suivi de la méthode, des utilisateurs et de maintenir les compétences.





Merci pour votre attention