

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE.  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1 -**



**FACULTE DE MEDECINE.  
DEPARTEMENT DE PHARMACIE.**

**Réf :64/DP /FM/UB/16.**

## **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

**Thèse d'exercice de fin d'études  
Présentée en vue de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie  
Session : Juillet 2017.**

**Présentée par :**

- **HALLAH Loubna**
- **RIOUGUI Khadidja**

**Devant le jury :**

- **Présidente : Pr S.ABDI, Professeur en biochimie, laboratoire central de biologie unité Frantz Fanon CHU de Blida.**
- **Examinatrice 1 : Dr S. OUKID, Maitre assistante en microbiologie, laboratoire central de biologie, unité H.Benbouali, CHU de Blida.**
- **Examinatrice 2 : Dr S.OUNAS, praticienne assistante chef en biologie clinique, laboratoire central de biologie unité Frantz Fanon, CHU de Blida.**
- **Promoteur : Pr R.BELOUNI, Professeur en microbiologie, laboratoire central de biologie unité Frantz Fanon, CHU de Blida.**

*REMERCIEMENT*

## **REMERCIEMENTS**

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur le PR.BELOUNI, son précieux conseil et son aide durant toute la période de travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions .

Enfin, nous tenons également à remercier le Dr M. Mahfoud , Directeur – Adjoint du Département de Pharmacie pour ses efforts et toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail .

*LOUBNA et KHADIDJA*

*Dédicaces**LOUBNA*

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,

A LA MEMOIRE DE MA MERE ,

Ce travail est dédié à ma mère,décédée trop tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. J'espère que,du monde qui est sien maintenant,elle apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui à toujours prié pour le salut de son âme.Puisse Dieu,le tout puissant,l'avoir en sa sainte miséricorde !

A MON CHER PERE,

Tous les mots ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance pour ton dévouement et tes sacrifices, tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'épauler. Je te dédie cette thèse, puisse tu y trouver le fruit de tes efforts.

A MA TRES CHERE SŒUR *HADJER*,

Je te remercie pour ton soutien continu. Je suis chanceuse de t'avoir à mes côtés. Puisses-tu trouver dans mon travail le témoin de mon amour et de mon affection.

A MES CHERS FRERES ; *MOHAMMED , DJEMELDINNE , YUCEF , ABD ESSAMED*

Pour leur grand amour et leur soutien qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute gratitude.

A MON MARI *MOHAMMED*

Avec tout mon amour, je te remercie pour ton soutien inconditionnel .Ton amour et ton affection remplissent mes jours de bonheur.

A MON PETIT BEBE ENCORE FŒTUS, *ABD EL METINE*

Je te remercie d'avoir été gentil et patient durant mes nuits d'études. Ta présence me tenait compagnie, chacun de tes petits mouvements m'apportait joie et bonheur.

A MES COUSINES *RABEA* et *FAIZA*.

A *KHADIDJA* d'avoir été mon binôme.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ma formation.

*Dédicace*

*Khadidja*

Je dédie cet humble travail avec grand amour, Sincérité et fierté :

A mes chers parents, sources de tendresse, de noblesse et d'affections.

A ma grande sœur *HANANE*, son mari et ses enfants *ADAM* et *MIRALE* avec mes souhaits de bonheur de santé et de succès.

A mes très chères sœurs *AMINA*, *AICHA*, *RANIA*, et *NOUR ELYAKINE* qu'elles m'ont toujours aidé d'avancer et donner le maximum.

A tous les membres de ma famille.

A mon binôme Loubna qu'elle a partagé avec moi mon humeur durant les moments de stress.

Mes sincères dédicaces à mon amie : *IMANE* qui m'a toujours aidé avec mes souhaits de réussite.

A notre promoteur : professeur *R. BELOUNI*.

Sans oublier tous les professeurs et à tout personnes qui compulsent ce travail.

# Table des matières

Remerciement.....	II
Dédicace.....	III
Sommaire.....	IV
Liste des tableaux.....	V
Liste des figures.....	VI
Liste des abréviations.....	VII

## PARTIE THEORIQUE

### Chapitre I : Introduction

### Chapitre II : Définitions

II.1 la qualité.....	4
II.2 l'assurance qualité.....	4
II.3 le système de gestion de la qualité.....	4
II.4 La certification.....	5
II.5 L'accréditation.....	5
II.6 Principales organisations de normalisation.....	5
II.7 Les normes.....	5

### Chapitre III : Les référentiels qualité applicables dans un laboratoire de biologiemédicale (normes)

III.1 Le GBEA.....	8
III.2 La norme ISO 17025.....	8
III.3 La norme ISO15189.....	8
III.4 La référence CLSI.....	8
III.5A propos de la certification.....	9
III.6 A propos de l'accréditation.....	9
III.6.1 A propos de L'accréditation en Algérie.....	10
III.6.2 A propos de L'accréditation en France.....	10

### Chapitre IV : Organisation du laboratoire de microbiologie médicale

IV.1 Domaines d'activité spécifiques.....	12
IV.2 Organigramme du laboratoire.....	12
IV.3 Le personnel.....	12
IV.4 L'accueil au niveau de la réception.....	14
IV.5 Le secrétariat.....	14
IV.6. Les prélèvements d'échantillons.....	15
IV.7 Le tri des échantillons.....	16
IV.8. La salle de stockage de consommables et réactifs.....	16
IV.9. Laverie.....	19

## **TABLE DES MATIERES**

IV.10 Le contrôle des équipements du laboratoire de microbiologie :la Métrologie.....	21
IV.11 Entretien des locaux.....	25
IV.12 Communication interne.....	25
IV.13 Elimination des déchets.....	25

## **Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité**

V.1 Les étapes de l'examen bactériologique.....	27
V.1.1 La phase préanalytique des analyses de microbiologie médicale.....	27
V.1.1.1 Prescription médicale : la fiche de renseignement.....	27
V.1.1.2 La prescription détaillée (ou une fiche de liaison).....	28
V.1.1.3 L'exécution du prélèvement.....	29
V.1.1.4 Délai de transport et conservation des échantillons.....	31
V.1.1.5 Sécurité.....	32
V.1.1.6 Risques d'erreurs.....	33
V.1.1.7 Liste des circonstances justifiant un refus d'analyse par le laboratoire.....	33
V.1.2 La phase analytique : modalités de l'examen bactériologique.....	34
V.1.2.1 Diagnostic bactériologique des principales infections.....	34
V.1.2.1.1 Des méningites bactériennes.....	34
V.1.2.1.1.1 Prélèvements de LCR et d'Hémoculture.....	34
V.1.2.1.1.2 Examen microscopique direct.....	35
V.1.2.1.1.3 Mise en évidence d'antigènes solubles.....	35
V.1.2.1.1.4 Biologie moléculaire.....	35
V.1.2.1.1.5 Etude biochimique du LCR.....	36
V.1.2.1.1.6 Interprétation des résultats de l'examen cyto-chimique du LCR.....	36
V.1.2.1.1.7 Mise en culture de prélèvement.....	36
V.1.2.1.1.8 Identification bactérienne.....	37
V.1.2.1.1.9 Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	37
V.1.2.1.2 Examen cyto bactériologique des urines (ECBU).....	37
V.1.2.1.2.1 Prélèvement.....	37
V.1.2.1.2.2 Acheminement.....	38
V.1.2.1.2.3 Renseignements accompagnant le prélèvement.....	38
V.1.2.1.2.4 Techniques d'analyse au laboratoire.....	38
V.1.2.1.2.5 Examen microscopique direct.....	38
V.1.2.1.2.6 Autres analyses.....	39
V.1.2.1.2.7 Examen direct après coloration.....	39
V.1.2.1.2.8 Bandelettes réactives chimiques.....	39
V.1.2.1.2.9 Mise en culture.....	40
V.1.2.1.2.10 Modes d'ensemencement.....	41
V.1.2.1.2.11 Appareils et méthodes automatiques.....	42
V.1.2.1.2.12 Incubation des urocultures.....	42

## TABLE DES MATIERES

V.1.2.1.2.13	Interprétation des urocultures.....	42
V.1.2.1.2.14	Identification et antibiogramme.....	44
V.1.2.1.3	Analyse bactériologique des selles.....	44
V.1.2.1.3.1	Prélèvements.....	45
V.1.2.1.3.2	Examen microscopique.....	45
V.1.2.1.3.3	Ensemencement.....	46
V.1.2.1.3.4	Diagnostic différentiel du genre <i>Shigella</i> .....	47
V.1.2.1.3.5	Examen direct.....	47
V.1.2.1.3.6	Mise en évidence des toxines.....	48
V.1.2.1.3.7	Culture et mise en évidence de la bactérie dans les selles.....	48
V.1.2.1.3.8	Analyse semi-quantitative des selles.....	49
V.1.2.1.4	Hémoculture.....	50
V.1.2.1.4.1	Vitalité des corps bactériens dans les flacons d'hémoculture.....	50
V.1.2.1.4.2	Milieux d'hémocultures.....	51
V.1.2.1.4.3	Nature du milieu.....	51
V.1.2.1.4.4	Conditions physicochimiques et additifs présents dans les milieux.....	51
V.1.2.1.4.5	Prélèvements.....	52
V.1.2.1.4.6	Acheminement.....	55
V.1.2.1.4.7	Incubation des flacons.....	55
V.1.2.1.4.8	Traitement des flacons ensemencés.....	56
V.1.2.1.4.9	Examen microscopique.....	56
V.1.2.1.4.10	Ensemencement.....	56
V.1.2.1.4.11	Interprétation.....	57
V.1.2.1.5	Analyse bactériologique des suppurations (pus).....	58
V.1.2.1.5.1	Rappel anatomo-clinique.....	58
V.1.2.1.5.2	Prélèvements.....	59
V.1.2.1.5.3	Transport et stockage.....	59
V.1.2.1.5.4	Traitement de l'échantillon.....	60
V.1.2.1.5.5	Examen direct.....	60
V.1.2.1.5.6	Milieux de culture.....	60
V.1.3	La phase post analytique.....	60
V.1.3.1	Vérification de la validité du résultat de l'analyse.....	61
V.1.3.2	Validation biologique du résultat d'analyse.....	61
V.1.3.3	Gestion des résultats d'alerte et des résultats critiques.....	61
V.1.3.4	Validation automatique.....	62
V.1.3.5	Signature des rapports.....	62
V.1.3.6	Présentation du rapport d'analyse.....	62
V.1.3.7	Ajout d'un commentaire sur le rapport.....	63
V.1.3.8	Émission du rapport d'analyse.....	63
V.1.3.9	Transmission du rapport.....	63
V.1.3.10	Correction d'erreurs sur les rapports.....	64

## **TABLE DES MATIERES**

V.1.3.11 Conservation des rapports.....	65
V.1.3.12 Conservation des échantillons après l'analyse.....	65
V.1.3.13 Élimination des échantillons.....	65
V.1.3.14 Destruction des documents renfermant des renseignements personnel.....	65
V.2 Sécurité biologique et sureté biologique.....	65
V.2.1 La sécurité au laboratoire.....	66
V.2.2 Microorganismes et niveau de risque.....	66
V.2.3 Les postes de sécurité microbiologiques (PSM).....	66
V.2.4 Niveaux de confinement.....	67
V.2.5 Les modes Opérateurs Normalisés.....	68
V.2.6 Evaluation de l'assurance qualité au laboratoire.....	68

## **PARTIE PRATIQUE**

I.Objectifs.....	71
II.Matériels et méthode.....	71
Matériels.....	71
Méthode.....	72
Les antibiotiques à tester.....	72
Quelques recommandations du CLSI.....	73
III. Résultats.....	74
IV.Discussion.....	78
Conclusion.....	80
Références bibliographiques.....	81
Annexes.....	85
Glossaire .....	90

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1 :** Normes de stockage en matière de biosécurité des produits de laboratoire

**Tableau 2 :** Antibiotiques validés pour le CQI de l'antibiogramme d'*E. coli* ATCC 25922

**Tableau 3 :** Antibiotiques validés pour le CQI de l'antibiogramme de *S. pneumoniae* ATCC 49619

**Tableau 4 :** Antibiotiques validés pour le CQI de l'antibiogramme de *P. aeruginosa* ATCC27853

**Tableau 5 :** Antibiotiques validés pour le CQI de l'antibiogramme de *S. aureus* ATCC 25923

**Tableau 6 :** Valeurs limites des diamètres d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité

**Tableau 7 :** (suite) : valeurs limites des diamètres d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1** :Etape de diagnostique bactériologique dans une démarche qualité.

**Figure 2** :Secrétariat d'un laboratoire de bactériologie médicale.

**Figure 3** :Salle de prélèvement

**Figure 4** :La laverie

**Figure 5** :Ponction lombaire(PL)

**Figure 6** :Cellule de Malassez

**Figure 7** :Exemple d'uroculture quantitative sur milieu chromogène

**Figure 8** :Ensemencement d'une urine

**Figure 9** :Flacons d'hémocultures présents sur le marché

**Figure 10** :Procédure de prélèvement direct des flacons d'hémocultures

**Figure 11** :les postes de sécurité microbiologique (hotte)

**Figure 12** : Test de sensibilité aux antibiotique(milieu Muller Hinton)

**Figure 13** :Protocole de surveillance des tests de contrôle de qualité(CQ)

## Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique  
AES : Accident d'Exposition au Sang  
AET : Aspiration Endo-Trachéale  
AFAQ : Association Française pour l'Assurance de la Qualité  
AFNOR : Association Française de Normalisation  
ALGERAC : l'Organisme Algérien d'Accréditation  
ANAES : l'Agence Nationale d'Accréditation des Etablissements de santé  
ANC : Acide Nalidixique-Colistine)  
ARAC : Arabe Accréditation Coopération  
ARN : Acide Ribo-Nucléique  
ATB : Antibiotique  
ATCC : American Type Culture Collection  
BK: Bacille de Koch  
BLSE : B-Lactamase à Spectre Etendu  
BMR : Bactéries Multi-Résistantes  
BVQI : Bureau Veritas Quality International  
CDC : Center for Disease Control  
CEN : Commission Européenne de Normalisation  
CHU : Centre Hospitalo Universitaire  
CLED : Cystine-Lactose-Electrolyte Déficient  
CLIN: Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales  
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute  
CMI: Concentration Minimale Inhibitrice  
CMV: Cyto-Mégalo-Virus  
CNR : Centre national de référence  
CO<sub>2</sub> : dioxyde de Carbone  
COFRAC: Comité Français d'Accréditation  
QCE : Contrôle de Qualité Externe  
CQI : Contrôle de Qualité Interne  
CRP : Protéine C-Réactive  
DAEC : Diffusely-Adhering E. Coli  
DDASS : La Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales  
DRASS : Les Direction Régionales des Affaires Sanitaires et Sociales  
EA : Européen coopération for Accréditation  
EAggEC : *E. Coli* Entéro-Agrégatifs  
ECBU : Examen Cyto-Bactériologique des Urines  
ECP : Effet Cyto-Pathogène  
EHEC : *E. Coli* Entéro-Hémorragiques  
EIEC : *E. Coli* Entéro-Invasifs  
EPEC : Les *E. Coli* Entéro-Pathogènes  
ETEC : *E. Coli* Entéro-Toxinogènes  
GBEA : Le Guide de Bonne Exécution des Analyses  
GNA : Glomérulo-Néphrite Aigue  
HAS : Haute Autorité de Santé  
I : bactérie Intermédiaire  
IFI : Immuno-Fluorescence Indirecte

## **Listes des abréviations**

ILAC :International Laboratory Accreditation Coopération.  
ISO : l'organisation internationale de normalisation  
ITU : L'Infection du Tractus Urinaire  
LBA : Liquide Broncho-Alvéolaire  
LCR : Liquide Céphalo Rachidien  
MADO : Maladies A Déclaration Obligatoire  
MAGAC : Membre fondateur du Réseau Maghrébin d'Accréditation.  
MGG: May-Grünwald-Giemsa  
MRSA: Staphylococcus Aureus Résistant à la Méricilline  
NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards  
OMA : Otite Moyenne Aigue  
OMS : Organisation Mondiale de Santé  
ORL:Oto-Rhino-Laryngologie  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PCT : procalcitonine plasmatique  
PEG : Poly-Ethylène Glycol  
PH : Potentiel d'Hydrogène  
PL: Ponction Lombaire  
PSM: Poste de Sécurité Microbiologique  
PSP : Ponction vésicale Sus-Pubienne  
PTT : Purpura Thrombotique Thrombocytopénique  
R : bactérie Résistante  
RAA : Rhumatisme Articulaire Aigu  
S : bactérie Sensible à un antibiotique  
SGA : Le Steptocoque du Groupe A  
SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique  
SIL : Système d'Information du Laboratoire  
SPS : Polyanéthol Sulfonate de Sodium  
SRIS : Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique  
SS : *Salmonella Shigella*  
TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective  
USA:United States of America  
VIH :Virus de l'Immunodéficience Humaine  
VIM : Le Vocabulaire International des termes fondamentaux et généraux de Métrologie.  
VZV: Virus de la Varicelle et du Zona

Les abréviations des antibiotiques :

B lactamines :

PEN : Penicilline  
OXA : Oxacilline  
AMP : Ampicilline  
AMX : Amoxicilline  
PIP : Pèpiracilline  
CZO : Céfazoline  
FOX : Cefoxitine  
ATM : Aztrionam  
IPM : Imipènème

Les aminosides :

GEN : Gentamycine  
KAN : Kanamycine

**L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

### ***Listes des abréviations***

AMK : Amikacine  
TOB : Tobramycine  
NET : Nétilmycine  
Les macrolides :

CLI : Clindamycine  
ERY : Erythromycine  
PRI : Pristinamycine

Les phénicolés

CHL : Chloramphénicol

Polypeptides

CS : colestine

Les glycopeptides

VAN : Vancomycine  
TEC : Teicoplanine  
Les sulfamides

SXT : triméthoprim + sulfaméthoxazole

Les quinolones

CIP : Ciprofloxacine  
LVX : levofloxacine

Autres

FUS : Acide fusidique  
FOS : Fosfomycine

# **Chapitre I :Introduction**

# **Chapitre I :Introduction**

Notre sujet se limite à exposer l'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale; les autres spécialités biologiques telles la biochimie, l'hémobiologie, l'immunologie et la parasitologie ne font pas partie du cadre de notre étude.

Tout laboratoire réalisant des analyses de biologie médicale, doit disposer d'un système d'assurance qualité basé sur des procédures opératoires écrites concernant les différentes étapes de l'analyse, et les conditions de son exécution. La microbiologie médicale est concernée au plus haut point par la mise en œuvre d'une démarche qualité au sein de notre unité de microbiologie médicale du laboratoire central du CHU de Blida.

Ce système d'assurance qualité doit être permanent et prévoir une trace des contrôles effectués, sans laquelle il est difficile et parfois impossible de trouver une erreur et/ou d'en analyser les causes, pour en éviter les répétitions.

La mise en place d'un système d'assurance qualité au laboratoire est indispensable afin d'acquiescer la confiance des patients et des médecins prescripteurs.[8]

Les concepts de gestion de la qualité utilisés aujourd'hui sont apparus au 20<sup>ème</sup> siècle et proviennent principalement de la croissance des processus de production et de vente.

La gestion de la qualité a passé par plusieurs concepts, le contrôle de qualité est l'un des premiers concepts qui est développé depuis 1920 par shewhart mais ces concepts n'ont pas été appliqués au laboratoire jusque dans les années 1940.

Jusqu'en 2003, quatre normes, ISO 9000, 9001, 9004 et 9011 décrivaient les exigences qualité des différentes étapes du processus d'analyse biologique, Ces normes étaient imparfaitement adaptées aux laboratoires d'analyses médicales.

Depuis 2005, des normes plus spécifiques à la biologie médicale ont été développées. La norme la mieux adaptée aux laboratoires d'analyses médicales en biologie humaine est actuellement la norme ISO 15189 recommandée par la Société française de biologie. Au niveau européen, la Commission européenne de normalisation (CEN) édite des normes internationales, qui peuvent être des normes ISO validées CEN. la gestion de la qualité n'est donc pas un nouveau concept.

En France, l'année 2010 a été celle de la mise en place d'un nouveau dispositif visant à obtenir la qualité dans chaque laboratoire de biologie médicale à l'horizon 2016 (option bio, l'actualité du praticien biologiste, supplément au n°444-novembre 2010)

En Algérie, ALGERAC organisme algérien d'accréditation est créé le 6 décembre 2005 pour faciliter le processus d'accréditation pour le secteur de la santé.[13]

# **Chapitre II : Définitions**

## Chapitre II : Définitions

### II.1 La qualité

c'est l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou d'un service, qui lui confère l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites .[44]

### II.2 L'assurance qualité en microbiologie médicale

c'est l'ensemble des actions préétablies et systématiques nécessaires, pour donner la confiance appropriée, en ce qu'un produit ou service satisfera aux exigences données relatives à la qualité.

- intervient dans toutes les étapes de l'examen bactériologique : pré analytique, analytique et post analytique.

- Désigne un ensemble de mesures qui permettent de vérifier l'exactitude et la précision des analyses de laboratoire et ce pour une technique reconnue et avec les limites bien définies.

- le but du contrôle de qualité est de vérifier et d'assurer la qualité des résultats des examens de laboratoire, de détecter les erreurs et surtout d'apporter les mesures correctives qui s'imposent.

- permet de vérifier le bon fonctionnement de l'équipement ainsi que la précision et l'exactitude d'une technique.[39]

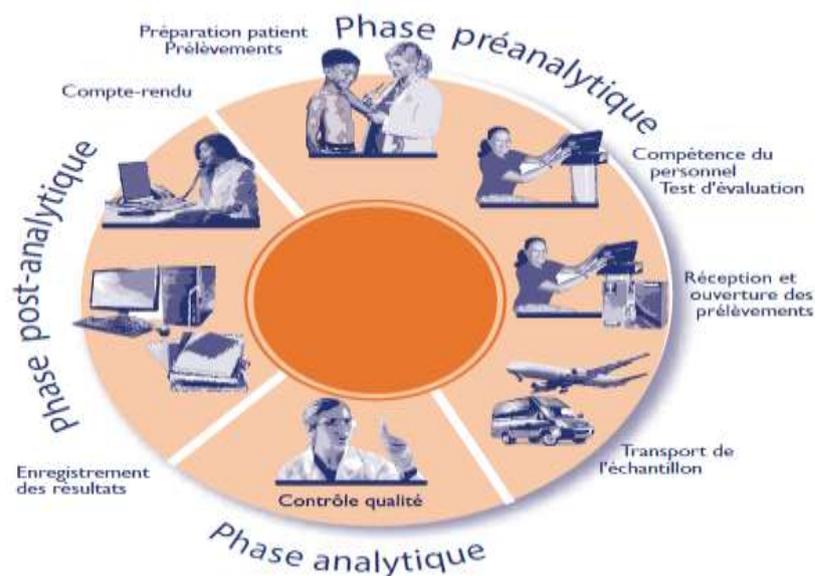
### II.3 Le système de gestion de la qualité

Peut être défini comme les actions coordonnées dirigeant et contrôlant les activités d'une organisation vis-à-vis de la qualité. Cette définition est celle utilisée par l'organisation internationale de normalisation (ISO) et par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Ces deux groupes sont internationalement reconnus comme des organisations de normalisation pour les laboratoires. Le contrôle de qualité de l'antibiogramme en Algérie est basé sur les normes CLSI adoptés par le comité des experts médicaux algériens depuis le 1<sup>er</sup> janvier 1999.

Dans un système de gestion de la qualité, tous les aspects de l'activité du laboratoire, incluant la structure organisationnelle, les processus, et les procédures doivent être étudiés, afin d'en assurer la qualité.[41]

## Chapitre II : Définitions



**Figure 1** : Etapes du diagnostic bactériologique dans une démarche qualité [37]

-Modalités des processus de laboratoire :

Des mécanismes et procédures sont mises en œuvre dans un laboratoire et chacun d'entre eux doit être exécuté correctement afin d'assurer la justesse et la fiabilité des analyses.

Une erreur survenant dans une partie du cycle peut entraîner un résultat de laboratoire médiocre. Une méthode de détection des erreurs à chaque phase de l'analyse est nécessaire pour s'assurer de la qualité.

Les normes ISO regroupent les processus dans les catégories « préanalytique », « analytique » et « post-analytique » [38]

### II.4 La certification

reconnaissance par un organisme certificateur de la conformité d'un laboratoire à une norme donnée (Norme ISO / CEN 15189 par exemple). [23]

### II.5 L'accréditation

consiste à reconnaître par un organisme tiers une compétence d'un laboratoire à effectuer des analyses déterminées selon une norme de référence telle que la norme ISO / CEN 15189. [17]

### II.6 Principales organisations de normalisation

ISO : l'organisation internationale de normalisation (ISO ou International Standardisation for organisation) a édicté des normes pour la fabrication industrielle en utilisant une série de normes. Nous connaissons ces normes sous le nom de « normes ISO ». [47]

CEN : c'est la commission européenne de normalisation

### II.7 Les normes

sont des textes qui définissent la qualité, édités par une organisation internationale (ISO) qui fédère de nombreux pays. Les normes ISO définissent des normes internationales, appliquées

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## *Chapitre II : Définitions*

dans l'industrie. Dans cette optique plusieurs normes sont applicables aux laboratoires. Les textes de ces normes peuvent être obtenus moyennant finances, sur le site du comité français d'accréditation (COFRAC) [cofrac.fr](http://cofrac.fr). [43]

# **Chapitre III : Les référentiels qualité applicables dans un laboratoire de microbiologie médicale (normes de références)**

## **Chapitre III : Les référentiels qualité applicables dans un laboratoire de microbiologie médicale (normes de références)**

### **III.1 Le GBEA**

Le Guide de Bonne Execution des Analyses est un référentiel français expose les exigences de base en terme de qualité, légalement applicables à tout laboratoire. Il prend en compte toutes les étapes de l'analyse(phases pré\_per\_post\_analytique) il oblige les biologistes à définir une organisation du système qualité, en définissant les rôles et les responsabilités de chacun,et en instaurant l'utilisation de documents uniques décrivant les différents processus qui interviennent dans une analyse.Il exige des laboratoires le contrôle des instruments de mesure (métrologie). Il précise et étend les exigences de traçabilité à l'ensemble du processus d'analyse biologique. Il introduit notamment la notification systématique des non conformités (du prélèvement ou des réactifs) et précise la durée de conservation des archives (résultats en milieu hospitalier :20ans ;contrôle de qualité national :5ans ;documents qualité et contrôles de qualité internes :3ans). Enfin, il introduit la notion d'évaluation, en soulignant la nécessité,en cas de dysfonctionnement du système,d'y remédier par une action corrective et d'en vérifier l'efficacité. Les exigences du GBEA, nouvelles pour les laboratoires en 1994, sont maintenant devenues un mode de fonctionnement habituel, qui constitue un prérequis à toute démarche de certification ou d'accréditation complémentaire. La mise en place du GBEA est vérifiée au cours d'inspections prévus par les médecins et pharmaciens inspecteurs de la direction départementale des affaires sanitaires et sociales(DDASS) et des directions régionales des affaires sanitaires et sociales(DRASS). (Certains dysfonctionnement tels que des erreurs répétées dans les résultats ou l'absence de réponse au contrôle de qualité national peuvent déclencher une inspection.[45]

### **III.2 La norme ISO 17025**

Définit les « Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ». Genève, Organisation internationale de normalisation, 2005.[2]

### **III.3 La norme ISO 15189**

Norme internationale adoptée par la majorité des laboratoires de biologie médicale en vue d'obtenir l'accréditation des activités et des examens des laboratoires de biologie médicale.

Le référentiel ISO 15189 « Laboratoires d'analyses de biologie médicale » définit les exigences particulières concernant la qualité et la compétence. Depuis 2007, Cette norme a été mise à jour en 2012.(Genève, Organisation internationale de normalisation 2007).[25]

### **III.4 La référence CLSI**

organisation internationale de normalisation pour les laboratoires(USA) anciennement connu sous le nom de National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Le CLSI utilise un processus de consensus visant à développer des normes,servant de référence dans la recherche de la qualité en matière de résultats de l'antibiogramme : appliqué en Algérie depuis le 1<sup>er</sup> Janvier 1999.

Autres normes : Il existe de nombreuses autres organisations de normalisation, et de nombreux exemples de normes pour les laboratoires. Certains pays ont établi des normes qualité nationales pour les laboratoires et celle-ci s'appliquent spécifiquement aux laboratoires à l'intérieur du pays. Certaines normes s'appliquent seulement à certains domaines du laboratoire ou à certaines analyses. Des normes ont été établies par l'Organisation mondiale de la Santé pour certains programmes spécifiques et certains domaines. [4]

### **III.5 A propos de La certification**

est la reconnaissance par un organisme certificateur(AFAQ/AFNOR ou BVQI) de la conformité d'un laboratoire à une norme donnée, Le laboratoire qui souhaite une certification doit demander cette certification au COFRAC, en précisant à quelle norme il se réfère.C'est en effet le COFRAC qui délivre les autorisations aux organismes certificateurs. A l'heure actuelle,c'est la certification ISO/CEN 15189 qui paraît la plus intéressante pour les laboratoires.[10]

### **III.6. A propos de l' accréditation**

L'accréditation pour un laboratoire consiste à «attester la compétence d'un laboratoire à effectuer des analyses déterminées selon une norme de référence qui lui permet d'assurer et de prouver une production et un maintien de la qualité».L'accréditation peut ainsi porter sur un ou plusieurs secteurs d'activité, par exemple la bactériologie, l'immuno\_serologie, etc.[10]

Depuis la mise en place de la norme ISO 15189, qui recouvre l'ensemble de l'activité de biologie médicale,il est possible d'obtenir une accréditation plus large. L'organisme responsable de l'accréditation en France est le COFRAC(comité français d'accréditation).Le COFRAC accompagne le laboratoire dans sa démarche d'accréditation. En particulier, des guides rédigés par les auditeurs du COFRAC sont accessibles gratuitement sur son site internet. L'accréditation est délivrée à l'issue d'un audit pour une durée de 5ans, renouvelables,avec une visite de contrôle à 15mois, en Algérie cette durée est de 3 ans renouvelables aussi avec une visite de contrôle de 15 mois. Le processus est long et fastidieux, mais le laboratoire obtient une reconnaissance de niveau international.[10]

L'accréditation/certification au niveau de l'établissement de santé est une reconnaissance nationale par la Haute Autorité de Santé,HAS.

Le manuel d'accréditation édité par l'Agence Nationale d'Accréditation des Etablissements de santé(ANAES),aujourd'hui remplacée par la Haute Autorité de Santé (HAS) concerne les laboratoires impliqués dans un établissement de santé.Il a pour objectif d'apprécier de façon globale la qualité et la sécurité des soins dispensés dans un établissement de santé,mais aussi l'implication des professionnels de l'établissement dans l'amélioration de la qualité,dans l'objectif d'une accréditation de l'établissement. Il s'agit plutôt d'un guide méthodologique, destiné à faciliter l'autoévaluation qui précède obligatoirement la visite d'accréditation de l'établissement.Au cours de la visite d'accréditation, l'accent est mis sur la dynamique d'évaluation, et les procédures transversales,c'est-à-dire impliquant plusieurs services de spécificité différente, clinique, clinicobiologique ou administratifs, au bénéfice du patient. A ce titre, le laboratoire de microbiologie est concerné,et notamment les missions du Comité de lutte contre les infections nosocomiales. Le remplacement par la loi du 13 août 2004 de

**L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

l'ANAES par la haute Autorité de santé(HAS), organisme d'expertise scientifique, consultatif, public et indépendant a conduit au remplacement de l'«*accréditation*» par une «*certification*». Le guide proposé par la HAS met l'accent sur l'évaluation des pratiques professionnelles dans chaque catégorie de personnel, exercice obligatoire depuis 2004 .

La politique qualité d'un laboratoire d'analyse médicale doit donc évoluer au fil du temps et passer progressivement des obligations du GBEA à une démarche volontaire d'évaluation et d'amélioration de la qualité, dans la perspective d'une certification ou d'une accréditation du laboratoire pour tout ou partie de son activité . cette «*démarche qualité* » correspond à une amélioration continue de la qualité qui implique la direction de l'établissement et le responsable du laboratoire sur des objectifs clairement définis .

D'excellents articles didactiques sont disponibles pour aider les biologistes à mettre en place le GBEA au sein de leurs laboratoires .Nous ne développerons donc ci-dessous que quelques points , dont la mise en œuvre est parfois complexe.[10]

### **III.6.1 A propos de L'accréditation en Algérie**

L'ALGERAC est l'Organisme Algérien d'Accréditation.

Créé par le Décret exécutif n° 05-466 du 4 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005, l'organisme Algérien d'Accréditation (ALGERAC) est un établissement public à caractère industriel et commercial, doté de la personnalité morale et de l'autonomie financière. ALGERAC est placé sous la tutelle du Ministère de l'Industrie et des Mines.

ALGERAC fait partie d'ARAC (Arabe Accréditation Coopération) 2010. MAGAC (Membre fondateur du Réseau Maghrébin d'Accréditation) Juin 2011.

ILAC (International Laboratory Accréditation Coopération) Septembre 2011.EA (Européen coopération for Accréditation) Novembre 2011.

-A l'année 2012, aucun laboratoire médical n'a réellement entamé un processus d'accréditation (pharma/linka 4<sup>ème</sup> Trimestre 2012). [32]

### **III.6.2 A propos de L'accréditation en France**

Réforme de la biologie médicale en 2007 .a abouti à une ordonnance en 2010 impose : Une accréditation des labos avant Novembre 2016 selon la norme internationale ISO 15189 ; cette accréditation exige la mise en place d'un système de management de la qualité dont la vérification est réalisée par la COFRAC (comité français d'accréditation). [24]

# **ChapitreIV :Organisation du laboratoire de microbiologie médicale**

# Chapitre IV : Organisation du laboratoire de microbiologie médicale

Le laboratoire de biologie médicale engagé dans procédure de démarche qualité doit être organisé en :

## IV.1 Domaines d'activités spécifiques

Unités de bactériologie, virologie, sérologie infectieuse, biologie moléculaire, tuberculose...

## IV.2 Organigramme du laboratoire

S'il s'agit d'une grande structure (p.ex. un hôpital), le laboratoire collabore avec d'autres départements, tels que les départements des ressources humaines, de formation, des finances, des achats, ainsi qu'avec les services d'appui technique. [1]

Au CHU de Blida le laboratoire collabore principalement avec le service pharmacie (approvisionnement en réactifs et consommables), la direction des équipements et de la maintenance.

## IV.3 Personnel

-Personnel d'encadrement: un chef de service, médecins et pharmaciens

-Personnel technique : biologistes para médicaux, diplômés instituts de biologie (ingénieurs ,DES) . [29]

### IV.3.1 Le directeur du laboratoire de microbiologie

Doit être médecin ou pharmacien titulaire du Diplôme d'Etude Médicales de Spécialité (DEMS), détient l'autorité, la compétence et la responsabilité des services fournis.

- conçoit, approuve, met en œuvre et entretient le système de gestion de la qualité ;
- fait en sorte que les ressources humaines et matérielles nécessaires, ainsi que l'information utile, soient disponibles afin de permettre un fonctionnement et un contrôle efficaces des processus entourant le système de gestion de la qualité ;
- délègue certaines tâches au personnel qualifié (surveillant médical) ;
- choisit les fournisseurs ;
- gère les contrats ;
- assure une formation adéquate ;
- assure la communication interne et externe.

La direction du laboratoire garantit les points suivants :

- aucune activité n'est susceptible de compromettre la performance du laboratoire ;
- des procédures appropriées sont mises en place pour garantir le respect éthique des échantillons des patients et la confidentialité des données concernant les clients ;

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

- les devoirs et responsabilités du personnel du laboratoire sont définis ;
- un système adéquat de communication est mis en place au sein du laboratoire : téléphone, fax, internet.

un responsable qualité et un responsable de la biosécurité sont désignés. [14]

#### **IV.3.2 Le responsable qualité**

- évalue les installations, procédures, pratiques ainsi que la formation du personnel participant aux activités du laboratoire, en fonction du système de gestion de la qualité ;
- examine chaque année le plan relatif à la qualité et recommande toute révision nécessaire au directeur du laboratoire ;
- demande conseil à différents départements et spécialistes et peut avoir besoin de l'aide d'experts indépendants ;
- organise un programme d'audit interne et informe le directeur du laboratoire des résultats ;
- fait en sorte que le système de gestion de la qualité soit géré et entretenu ;
- définit et contrôle tous les processus et procédures liés au système de gestion de la qualité ;
- résout les points de non-conformité ;
- fait en sorte que des mesures soient prises pour obtenir une amélioration constante de ces processus/activités ;
- fait en sorte que tout le personnel bénéficie d'une formation actualisée concernant le système de gestion de la qualité. [22]

#### **IV.3.3 Le superviseur/personnel autorisé**

planifie et coordonne le programme de travail quotidien ;

- assure la gestion des stocks et du matériel ;
- fait en sorte que les activités/processus compris dans le champ d'application du système de gestion de la qualité soient identifiés et exécutés conformément au présent manuel ;
- applique les techniques et critères nécessaires pour vérifier que les processus/activités ainsi que les contrôles mis en œuvre sont efficaces ;
- évalue et identifie les nouveaux produits. [19]

#### **IV.3.4 Le technicien principal/supérieur**

- gère, protège et préserve les stocks ;
- gère et entretient le matériel ;
- fournit au personnel des conseils concernant les procédures liées à la qualité au laboratoire ;
- signale au superviseur les problèmes importants observés dans la pratique quotidienne. [31]

### **IV.3.5 Le technicien**

- effectue les examens ;
- contrôle et entretient le matériel ;
- signale au technicien principal les problèmes importants observés dans la pratique quotidienne ;
- vérifie les résultats des contrôles internes de la qualité afin de valider les examens. [46]

### **IV.4 L'accueil au niveau de la réception**

Selon ses activités, le laboratoire reçoit des personnes venant :

-se faire prélever par le personnel du laboratoire.

-déposer des échantillons primaires.

-Retirer des résultats d'analyses.

Le personnel accueille les patients et enregistre les informations nécessaires à constitution de leur dossier, en tenant compte de la confidentialité vis à vis des autres malades qui patientent et des autres membres du personnel, les échantillons primaires réceptionnés par le personnel de l'accueil sont déposés dans une zone dédiée bien délimitée et distincte des autres zones de la banque d'accueil. les spicimens sont alors identifiés par des codes(N° d'identification) qui les suivront tout au long de leur parcours dans le laboratoire. Le personnel extérieur apportant des prélèvements est orienté directement vers la salle de tri des échantillons. Le personnel d'accueil doit également gérer les flux de clients entrant et sortant ainsi que les personnes en attente de résultats. Le personnel a ce poste est en contact avec le public, mais également avec des échantillons potentiellement pathogènes. En fonction de l'état de l'emballage de l'échantillon et de l'organisation du travail, il peut y avoir un risque biologique à ce poste. [11]

### **IV.5 Le secrétariat**

Le personnel du secrétariat effectue des taches administratives (retranscription des comptes rendus, expédition des résultats d'analyses, facturation) et s'occupe également du classement des archives. Un important travail de bureautique est effectué par ce personnel. Dans certains cas, ces fonctions sont assurées par le personnel de l'accueil. Toutefois, pour limiter le nombre de personnes potentiellement exposés aux risques biologiques, il est préférable de séparer les fonctions administratives pures et les activités nécessitant des contacts avec échantillons. [12]



**Figure 2 :** Secrétariat d'un laboratoire de bactériologie médicale.

#### **IV.6 Les prélèvements d'échantillons**

En laboratoire d'analyses de biologie médicale, le patient passe de la zone d'accueil ou d'attente, aux salles de prélèvement permettant de l'isoler des autres personnes.

Différents types de prélèvement peuvent être effectués (sang, sécrétions vaginales ou urétrales, abcès ...), nécessitant différents positions de la part du patient (debout, assis, couché, position gynécologique), qui peut être amené à se dévêtir.

Dans tous les cas, le préleveur doit pouvoir prendre différentes positions pour s'orienter de façon optimale en fonction du type d'analyses du patient et des préférences du préleveur (gaucher, droitier).

L'utilisation de ce matériel mis en contact avec des patients infectés présente donc un risque biologique. Les prélèvements sont ensuite déposés dans la zone de tri des échantillons. [15]



**Figure 3** :salle de prélèvement

#### **IV.7 Le tri des échantillons**

Les coursiers ou les infirmiers (ères) extérieurs apportent des prélèvements (qui peuvent parfois représenter un grand volume) directement dans la zone de tri des échantillons, qui reçoit également les prélèvements effectués par le personnel du laboratoire.

L'emballage des échantillons reprend aux prescriptions réglementaires (n°ONU 3373 l'arrêté ADR) et doit arriver au laboratoire en bon état. L'usage de pochettes transparentes permet au personnel de voir immédiatement l'état des échantillons, et de limiter l'exposition aux dangers biologiques. Les échantillons sont enregistrés (numéro d'identification, analyses requises...) grâce aux enregistrements portés sur la fiche de suivi qui les accompagne. Cette opération de tri et d'enregistrement est une étape essentielle qui nécessite un environnement calme pour éviter toute erreur d'étiquetage. D'un autre côté, le personnel doit également gérer les urgences et les pics d'activité. Dans ce cas, plusieurs personnes peuvent être affectées à ce poste. [18]

#### **IV.8 La salle de stockage de consommable et de réactifs**

##### **IV.8.1 fonctionnalité**

Les activités du laboratoire amènent à stocker des produits chimiques, des kits servant aux analyses, des échantillons biologiques, du matériel à usage unique, etc.

Selon les conditions de conservations de certains produits, il est nécessaire de créer des zones de stockage à différentes températures. le terme de « zone » ne préjuge pas la dimension de celle-ci. il peut s'agir d'un simple compartiment distinct dans une enceinte ou dans une

#### **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

pièce. Ainsi, selon le volume des activités du laboratoire, les produits pourront être stockés dans des enceintes (placards, réfrigérateurs) ou dans des salles de stockage spécifique (salle à température ambiante, chambre climatisée).

Différents zones de stockage séparées seront créées selon la nature des produits :

- les échantillons biologiques conservés après analyses, les échantillons de calibrage et les échantillons de contrôle ;
- les produits chimiques (kits, substance et préparation chimiques) ;
- les fournitures de bureau et le matériel à usage unique.

Selon le volume de stockage, ces zones pourront correspondre à des pièces différentes ou de situer dans une même pièce. Toutefois, pour limiter la propagation des incendies, on ne stockera pas les fournitures de bureau dans la même pièce que les produits chimiques.

Seul le personnel autorisé du laboratoire peut pénétrer dans les pièces pour effectuer plusieurs opérations :

- ranger et enregistrer les produits dans la salle de stockage
- aller chercher les produits dans la salle de stockage pour reconstituer le stock journalier des pièces techniques.

Une personne est généralement désignée pour gérer les stocks de chaque produit (évaluation des périmés et approvisionnement).

#### **IV.8.2 Emplacement et aménagement**

Les salles de stockage des produits sont idéalement localisées en fonction des paramètres suivants :

- sur une issue accessible aux véhicules de livraison, pouvant apporter parfois plusieurs palettes de produits par livraison.
- en relation de proximité avec les salles techniques, pour limiter les déplacements de produits dangereux et la création de « stocks sauvages » dans des salles techniques qui se trouveraient trop éloignées, il est fortement recommandé de pouvoir accéder au stockage sans avoir emprunter de marches, afin de permettre d'accès au chariot de transport et de limiter les risques de chute.

Ces locaux doivent être suffisamment spacieux pour :

\* recevoir la quantité nécessaire de tous les produits utilisés par le laboratoire :

- contenants allant de quelques millilitres à plusieurs dizaines de litres.
- contenants de formes variées (ampoules, berlingot, flacon, bidon...)

### **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

\*créer des zones de stockages séparant :

-les différents produits chimiques incompatibles (encadré « principes de séparation des produits chimiques »)

-éventuellement, selon l'organisation du laboratoire, les produits et le matériel en fonction des pièces ou ils sont utilisés, des manipulations concernées... ;

\*comprendre des ameublements spécifiques :

-des étagères avec un dispositif de rétention en cas de déversement accidentel de liquide,

-des réfrigérateurs et congélateurs (éventuellement utilisables en zone 2 (emplacement ou atmosphère explosive consistant en un mélange avec l'air de substances inflammables sous forme de gaz, de vapeur ou de brouillard).

Selon leur emplacement pour les échantillons biologiques et les réactifs. Des sondes placées dans ces enceintes permettent d'en contrôler la température.

-des réfrigérateurs et congélateurs de secours utilisés en cas de panne et lors des opérations de nettoyage des appareils ;

-une enceinte ventilée pour les produits chimiques étiquetés F (facilement inflammable) ou F+ (extrêmement inflammable)

-jusqu'à quatre armoires en fonction de l'étiquetage des produits (encadré « principe de séparation des produits chimiques »).

-des espaces suffisants entre les étagères et les meubles pour le passage du personnel et des chariots de transport.

Les substances ou préparations dangereuses classés comme très toxiques, toxiques, cancérigènes, tératogènes ou mutagènes doivent être placés dans des armoires fermées à clé ou dans des locaux où n'ont pas librement accès les personnes étrangères à l'établissement.

### **IV.8.3 Exigences spécifiques de conception**

-les échantillons biologiques conservés après analyse pour d'éventuels contrôles ultérieurs sont stockés au froid sur une durée courte.

Ils peuvent être conservés dans des zones réfrigérées des salles techniques.

Certains échantillons doivent être conservés pendant une durée réglementaire variant selon le type d'examen effectué. Cette conservation de longue durée, ou sérothèque sera effectuée dans des enceintes réfrigérées situées dans une salle de stockage spécifique ou non.

Le stockage des produits biologiques nécessite une pièce répondant aux critères suivants :

\*tous les revêtements des aménagements, les sols et murs devront être aisément accessibles au nettoyage et constitués de matériaux lisses résistant aux agents nettoyants et désinfectants ;

## **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

- \*l'éclairage recommandé est d'au moins 300 lux, pour assurer une bonne visibilité ;
- \*la température doit être adaptée au bon fonctionnement des congélateurs et réfrigérateurs ;
- \*les zones de stockage doivent être signalées par le pictogramme « risque biologique ». [21]

**Tableau 1:** Normes de stockage en matière de biosécurité des produits de laboratoire

Nouveaux pictogrammes	Descriptif	Solution de stockage
	<b>Inflammable*</b> Produits pouvant s'enflammer très facilement en présence d'une source d'inflammation.	armoie de sureté pour produits inflammables ou armoie de sécurité (30 ou 90 minutes)
	<b>Comburant*</b> Corps chimiques qui ont pour propriété de permettre la combustion d'un combustible.	armoie de sureté pour produits inflammables ou armoie de sécurité (30 ou 90 minutes)
	<b>Explosif</b> Produits capables d'exploser sous l'action d'un choc ou d'une source d'inflammation.	armoie de sécurité (90 minutes)
	<b>Gaz</b> Gaz sous pression contenus dans un récipient : risques d'explosion ou de brûlures.	armoie pour bouteilles de gaz
	<b>Nocif/Irritant</b> Par contact répétitif, provoquent des réactions inflammatoires avec la peau ou les muqueuses. Peuvent empoisonner à forte dose.	armoie de sûreté pour produits toxiques
	<b>Corrosif</b> Substances qui endommagent les tissus vivants (peaux, yeux, muqueuses)	armoie de sûreté pour produits toxiques avec protections anticorrosion en PEHD
	<b>Toxique</b> Substances présentant, même en petite quantité, un danger pour la santé.	armoie de sûreté pour produits toxiques
	<b>Dangereux pour l'homme</b> Produits pouvant être cancérigènes, mutagènes ou tératogènes. Ils peuvent également modifier le fonctionnement de certains organes.	armoie de sûreté pour produits toxiques
	<b>Dangereux pour l'environnement</b> Substances toxiques pour la faune, les organismes aquatiques, la couche d'ozone	armoie phytosanitaire

## IV.9 La laverie

### IV.9.1 Fonctionnalité

Cette pièce permet le nettoyage et la désinfection du matériel réutilisable ne pouvant pas encore être substitué par du matériel à usage unique.

Selon l'organisation du laboratoire le personnel occupant cette pièce peut effectuer plusieurs opérations :

- \*aller chercher le matériel à nettoyer dans les salles techniques, les salles de prélèvements, ou recevoir le personnel amenant du matériel sale ;
- \*déposer le matériel sale dans une zone distincte clairement indiquée dans la laverie ;

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

\*procéder au nettoyage et à la désinfection de façon manuelle ou automatique ;

\*apporter le matériel propre dans les salles techniques ou les salles de prélèvements.

Seul le personnel autorisé du laboratoire peut pénétrer dans la laverie qui peut être occupée par une, voire deux personnes travaillant simultanément.

#### **IV.9.2 Emplacement et aménagement**

La laverie est localisée en fonction des paramètres suivants :

-en relation de proximité avec les salles techniques et les salles de prélèvements :

-à l'écart des zones d'activité.

Ce local doit être suffisamment spacieux pour contenir :

-des paillasses permettant de déposer et séparer le matériel sale du matériel propre.

-un bac de récupération de produits contaminés ;

-un évier avec égouttoir de taille suffisante pour laver du matériel volumineux.

-des meubles de rangement pour :

\*le matériel et les produits de lavage.

\*les procédures, modes opératoires et documents de maintenance des appareils ;

-éventuellement les appareils suivants :

\*une machine à laver le linge pour les vêtements de laboratoire

\*une machine à laver la vaisselle de laboratoire,

\*une étuve de séchage

\*une autoclave

-un espace suffisant permettant de laver du gros matériel déposé à même le sol.

#### **IV.9.3 Exigences spécifiques de conception**

La conception de la laverie répond aux critères suivants :

-le sol, les murs et les aménagements doivent être aisément accessibles et constitués de matériaux lisses imperméables et résistants aux agents nettoyants et désinfectants.

-les revêtements plastifiés à joints thermo soudés seront préférés au carrelage avec joints.

-le sol doit être antidérapant et disposer d'un siphon.

-au moins une ventilation naturelle du local empêche que le degré d'humidité relative soit trop important.[21]



**Figure 4 :**La laverie

#### **IV.10 Le contrôle des équipements du laboratoire de microbiologie :la Métrologie**

La métrologie est la science de la mesure ,embrasse tous les aspects aussi bien théoriques que pratiques se rapportant aux mesurages » (mesurage : action de mesurer et donc d'effectuer une analyse quantitative ).A travers cette définition ,tirée du vocabulaire International des termes fondamentaux et généraux de Métrologie (VIM),on comprend le caractère fondamental de la maîtrise car la qualité des mesures retentit non seulement sur la qualité des analyses ;mais aussi sur la conservation des prélèvements,avant analyse,et après analyse au sein des biothèques.

le GBEA recommande que le responsable de l'assurance qualité du laboratoire doit s'assurer de la maintenance et du bon fonctionnement des instruments.Il s'agit la d'une fonction à part entière qui nécessite une organisation mais aussi une formation préalable .Le responsable métrologie du laboratoire ainsi qu'un nombre suffisant de techniciens doit bénéficier d'une formation en métrologie , concerne également les techniciens affectés dans le domaine de la métrologie particulièrement dans :

- la maîtrise des instruments d'analyse automatiques (automates de dénombrement) , d'analyse quantitatives (compteur de cellules),de coloration (Hematek), d'identification de lecture d'antibiogramme (Viteck),des matériels de mesure (pipettes et diluteurs, balances, chronomètres ,thermomètres), et des matériels dont la qualité intervient dans le résultats de l'analyse (étuves,bains marie ,blocs chauffants,réfrigérateurs,congélateurs,chambres froides ou chaudes,mais aussi spectrophotomètres,etc.) Outre le GBEA, la norme d'accréditation européenne NF/EN/ISO 10 012 et plusieurs documents pratiques édités dans les Annales de biologie clinique par la Société française de biologie clinique permettent de disposer des

#### **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

documents nécessaires à la formation spécifiques . La première étape est l'acquisition de quelques définitions. L'«exactitude» d'un résultat est sa capacité à se rapprocher autant que possible de la «valeur vraie». Cette valeur vraie est donnée par un étalon ou un calibrateur, et de ce fait est appelée «valeur de référence». L'exactitude du résultat nécessite la «justesse» de l'instrument ou de l'analyseur (capacité à fournir une mesure exempte d'erreur systématique) la répétitivité des résultats à l'intérieur d'une même série sur le même échantillon et la «reproductibilité» des résultats dans le temps sur des échantillons issus du même lot, mais traités dans des conditions de mesure qui varient. [50]

Chacun des matériels du laboratoire étant identifié, il est souhaitable d'établir un calendrier de surveillance des différents appareils concernés. Ainsi, on vérifie régulièrement la température des étuves, bains marie, réfrigérateurs, congélateurs, à l'aide des thermomètres intégrés aux appareils ou de thermomètres à sonde, trempée dans le glycérol. On pourra surveiller la teneur en CO<sub>2</sub> des étuves sur le même rythme. Un moyen simple permettant de détecter les ruptures de chaîne de froid dans des réfrigérateurs ou congélateurs fréquemment ouverts et l'utilisation de puces dont la couleur se modifie lors d'un changement de température. À ces puces, ou ces thermomètres, peut être associé un contrôle hebdomadaire, à l'aide d'un thermomètre de référence. Un relevé des températures, des anomalies et des actions correctives, sous forme de tableaux affichés permettra d'assurer la traçabilité. L'idéal est de disposer d'appareils dont les alarmes sont reliées à une surveillance centralisée ce qui est souvent le cas pour les congélateurs à -80° ou les chambres chaudes ou froides. Lorsque les moyens de l'établissement le permettent, une centrale de surveillance électronique des températures est la solution idéale. Dans le cas des matériels de mesure, un contrôle régulier des mesurages, à partir d'un matériel de référence, ou par le biais de chaînes d'étalonnage doit être prévu. Ainsi, il est possible, moyennant finances, de contrôler les thermomètres à l'aide de thermomètres étalons, raccordés aux thermomètres étalon nationaux, par le biais de laboratoires de métrologie accrédités COFRAC, et qui délivrent un certificat d'étalonnage. De même, un contrôle semestriel des pipettes (idéalement selon la fréquence recommandée par le fabricant, peut être effectué au laboratoire : un volume d'eau est prélevé puis posé sur une balance de précision et intégré dans un logiciel qui calcule le volume exact tenant compte de la température et de la pression atmosphérique. L'opération répétée est la moyenne des résultats et comparée à la valeur de référence (volume indiqué sur la pipette), le coefficient de variation calculé par le logiciel est comparé au coefficient de variation maximum considéré comme acceptable par le fabricant pour ce type de pipette. La métrologie s'étend à l'exactitude des mesures données en tant que résultat d'analyse. La fréquence et les modalités d'étalonnage et de calibrage des automates d'analyse, les contrôles journaliers, les procédures d'entretien et les décisions à prendre en cas d'anomalie doivent être connues, spécifiées dans les procédures, et appliquées. Enfin, un contrôle des flux des postes de sécurité microbiologiques sera nécessaire, semestriel par exemple. [26]

#### **IV.10.1 Exigences pour certains instruments**

Il est recommandé que certains instruments (entre autres, thermomètres, réfrigérateurs, balances, centrifugeuses) soient étalonnés par un organisme accrédité par le Conseil canadien des normes en partenariat avec le Service d'évaluation de laboratoire d'étalonnage (CLAS).

### **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

Les autres instruments qui ne sont pas mentionnés dans cette section doivent également être vérifiés s'ils ont une influence sur la qualité des résultats. Le cordon électrique de chaque appareil devrait être vérifié annuellement.

#### Réfrigérateur, congélateur, bain-marie et étuve

Le technologiste médical devrait vérifier la température à chaque utilisation. La fréquence d'enregistrement de la température doit être notée, conformément aux exigences et aux normes propres au secteur d'activité. Si l'instrument est muni d'un dispositif d'enregistrement continu de la température, le laboratoire doit avoir une procédure définissant le mode de surveillance incluant la fréquence du changement du graphique selon la spécification de l'instrument. Le technologiste médical doit consigner, dater et parapher, au moins à chaque jour, mais idéalement à chaque quart de travail, la température de chacun de ces instruments. L'exactitude des thermomètres utilisés doit être étalonnée annuellement à l'aide d'un thermomètre de référence. Les limites de tolérances doivent être déterminées pour chaque instrument en fonction de la méthodologie. Pour certains instruments, les limites de tolérances sont fournies par le fabricant.

#### Réfrigérateur, congélateur et étuve pour l'entreposage du sang total et des produits sanguins labiles

Ces appareils doivent être munis d'un système de surveillance continue de la température et munis d'un système d'alarme sonore. Ce système d'alarme doit retentir dans un endroit où il y a toujours du personnel. La température doit être mesurée et consignée au moins une fois toutes les huit heures. Si ces appareils ne sont pas munis d'un dispositif d'enregistrement continu de la température, la température doit être vérifiée à toutes les 4 heures. L'équipement utilisé pour l'entreposage des produits sanguins labiles et stables, y compris l'équipement situé à l'extérieur du service transfusionnel, doit être branché à une source de courant auxiliaire. Le système de courant auxiliaire doit être vérifié à des intervalles définis afin d'assurer un transfert immédiat à la source auxiliaire d'énergie.

#### Autoclaves

L'efficacité de la décontamination par autoclave dépend de plusieurs facteurs qui influencent la température à laquelle le matériel est soumis et la durée de contact.

L'enregistrement du cycle ainsi que l'utilisation d'un papier indicateur de stérilisation doivent faire partie de chaque utilisation. L'efficacité doit être vérifiée toutes les semaines avec un indicateur biologique (ou à chaque utilisation s'il est utilisé moins qu'une fois par semaine).

#### Balances

Les balances sont des instruments sensibles et devraient être installées dans un endroit où les facteurs d'influence spécifiés par le fabricant sont contrôlés. La balance de précision devrait être installée dans un endroit exempt de vibrations et de courants d'air. La balance doit être propre et parfaitement à niveau. S'il s'avère nécessaire de déplacer la balance, celle-ci devrait être remise à niveau. L'étalonnage de la balance doit être contrôlé à l'aide de poids étalons. Ces poids étalons doivent être accessibles, bien entretenus (dépourvus de corrosion) et étalonnés régulièrement. Les résultats de l'étalonnage doivent être consignés, datés et paraphés.

#### Centrifugeuses et cyto-centrifugeuses

Le laboratoire établit, en incluant au minimum les spécifications du fabricant, une procédure de maintenance préventive des centrifugeuses et des cyto-centrifugeuses qui comprend un calendrier des opérations de maintenance.

La maintenance doit inclure, entre autres, la vérification annuelle (ou plus si nécessaire) de la vitesse de centrifugation, généralement à l'aide d'un tachymètre ainsi que la vérification annuelle de la température pour les centrifugeuses munies d'un réfrigérateur interne. Les opérations de maintenance peuvent être effectuées en collaboration avec le Service de génie biomédical ou avec une autre personne habilitée à le faire, pourvu que les spécifications d'utilisation soient fournies par le laboratoire. Toutes les interventions doivent être consignées, datées et paraphées.

#### Enceinte de sécurité biologique

La sélection de la classe de l'enceinte de sécurité biologique doit être conforme au niveau de confinement selon le groupe de risque de microorganismes manipulés. Les enceintes de sécurité biologique devraient être installées conformément aux exigences énoncées dans la norme CSA/CAN Z316.3-95, *Installation et essai sur place des hottes biologiques (classe I et II)* et dans les *Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire* de Santé Canada. Ces exigences comprennent, entre autres :

- L'enceinte de sécurité biologique devrait être située loin des zones de grande circulation et loin des portes et des bouches d'admission et d'évacuation d'air qui risquent de perturber la direction des flux d'air.
- Il convient de prévoir une distance libre d'au moins 40 centimètres entre tout obstacle fixé au-dessus de l'enceinte et de la bouche d'évacuation. Le cas échéant, il faudrait prévoir une zone de 30 cm de chaque côté de l'enceinte afin d'en libérer l'accès pour l'entretien.
- Sous l'enceinte de sécurité biologique, l'approvisionnement au gaz naturel n'est pas recommandé pour stériliser les instruments d'ensemencement. Des micro-incinérateurs doivent être utilisés.
- Le fonctionnement des enceintes de sécurité biologique doit être vérifié par un organisme accrédité avant la mise en service de celles-ci, après chaque réparation ou déplacement, ainsi que chaque année. Un rapport de certification doit être remis à l'utilisateur, qui doit le conserver. Une étiquette doit être apposée à l'extérieur de l'enceinte, précisant la date de la certification effectuée et celle de la prochaine certification prévue.

-La procédure opératoire normalisée pour l'utilisation des enceintes de sécurité biologique doit être conforme aux procédures décrites dans *Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire*, de Santé Canada.

L'utilisation de bandelettes de papier (p. ex. : papier essuie-tout) fixées à la base de l'écran protecteur de l'enceinte, permet de vérifier l'efficacité de la circulation du flux d'air.

Cette vérification doit être effectuée quotidiennement avant l'utilisation et consignée.

Il est recommandé d'éviter de se déplacer derrière une personne effectuant des manipulations dans l'enceinte.

- Pour désinfecter les surfaces intérieures de l'enceinte, utiliser un désinfectant non corrosif.

#### Microscope

Un microscope ajusté et entretenu de façon optimale est un élément essentiel à l'exactitude et à la précision de tout examen microscopique.

Le technologiste médical doit posséder des connaissances de base au sujet des composantes et des principes du microscope.

La procédure d'utilisation du microscope devrait :

- décrire l'ajustement et la maintenance quotidienne;
- établir un calendrier de maintenance préventive;
- prévoir une vérification annuelle effectuée par un spécialiste;

### **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

-prévoir l'obligation de consigner, de dater et de parapher les opérations de maintenance préventive.

La procédure d'ajustement de l'éclairage, selon la méthode de Köhler, doit être décrite et être effectuée par le technologiste médical avant l'utilisation du microscope.

L'ajustement de l'éclairage de Köhler permet d'obtenir un éclairage total et uniforme du champ microscopique et une image claire et précise de l'objet observé.

#### Pipettes automatiques et diluteurs

Le technologiste médical doit vérifier l'exactitude et la précision de toute nouvelle pipette automatique ou de tout nouveau diluteur, avant la première utilisation, après chaque activité de maintenance préventive ou corrective selon les intervalles d'usage et au minimum une fois par année. Le laboratoire doit établir une procédure de vérification de l'étalonnage incluant un calendrier des procédures de maintenance selon les recommandations du fabricant ou toute autre norme reconnue. Le technologiste médical doit consigner, dater et parapher toutes ses interventions. [26].

**IV.11 Entretien des locaux:** chariot de ménage (eau de javel, sac poubelle, gants...)

#### **IV.12 Communication interne**

La direction fait en sorte qu'une communication adéquate soit mise en place pour informer le personnel.

Au CHU de Blida l'information passe par un tableau d'affichage : gardes, calendrier des prélèvements.

Des réunions hebdomadaires ont lieu pour l'ensemble du personnel du laboratoire. Au cours de ces réunions :

- les activités de la semaine sont passées en revue et les activités à entreprendre sont définies ;
- toutes les informations sur l'organisation générale, les activités et projets sont communiquées.

#### **IV.13 Elimination des déchets.**

Conformément à leur définition, les déchets se différencient en résidus ordinaires, directement pris en charge par les services de voirie, et en résidus à risque potentiel. Pour cette catégorie, une procédure d'élimination visant à supprimer le risque débutera à l'intérieur du laboratoire producteur du déchet. Elle concerne à la fois le produit d'analyse, les substances chimiques et le matériel servant à cette analyse.[9]

# **Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité**

# Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

## V.1 Les étapes de l'examen bactériologique

### V.1.1 La phase préanalytique des analyses de microbiologie médicale

Les principaux objectifs des analyses microbiologiques sont d'isoler et d'identifier les micro-organismes pathogènes et de mesurer leur sensibilité aux antibiotiques. Les analyses sont définies par le Guide de Bonne Exécution des Analyses comme un ensemble d'étapes successives, allant du prélèvement de l'échantillon biologique jusqu'à la remise des résultats. La qualité des résultats microbiologiques dépend aussi de celle des phases pré-analytique et analytique, ainsi que de la validation des résultats.

La phase pré-analytique comprend plusieurs étapes, dont la séquence et la coordination doivent être sans faille. Il s'agit en effet d'une phase "critique" pour laquelle le choix de l'échantillon et de ses modalités de prélèvement, de transport et de conservation doivent être de qualité optimale. Dans le cas contraire, les résultats des analyses risquent de n'avoir aucune utilité clinique.

La traçabilité, dans le respect de la confidentialité est une des garanties des démarches effectuées par plusieurs professionnels médicaux et para-médicaux.

Le prélèvement est effectué par le prescripteur, ou par un biologiste, ou par une personne déléguée (infirmier, technicien, interne), selon la réglementation en vigueur. Le prescripteur est celui qui juge de l'indication des analyses et en attend des résultats contribuant au diagnostic et à la thérapeutique. Qu'il soit ou non le préleveur, ses objectifs et ses constatations médicales doivent garantir la qualité et la sécurité des prélèvements.

La sécurité concerne le malade, lorsque les prélèvements sont invasifs, ainsi que les personnes qui effectuent le prélèvement, le transport ou les analyses microbiologiques. Les biologistes sont tenus de s'assurer de l'organisation des différentes étapes de la phase pré-analytique.

Ils doivent instruire toutes les personnes concernées pour effectuer les prélèvements et assurer le minimum de risques au malade et à l'entourage.

Lorsque le prélèvement est effectué au laboratoire, ces étapes sont sous la responsabilité immédiate du biologiste. Dans certains cas, un échantillon nécessite un pré-traitement, notamment lorsqu'une partie doit être transférée dans un autre laboratoire d'analyses. Cette manipulation doit être effectuée avec les mêmes précautions de sécurité et de sauvegarde de l'échantillon que celles prises lors du prélèvement.

En résumé, le prescripteur porte la responsabilité de l'indication de l'analyse microbiologique. Le biologiste assume réglementairement la responsabilité du prélèvement et du transport bien que cette disposition soit peu réaliste en pratique. Son rôle ensuite est de choisir les méthodes analytiques qu'il conduira et dont il interprétera les résultats. Lorsque ces méthodes impliquent des procédures particulières durant la phase pré-analytique, elles doivent être connues à la fois du prescripteur et du préleveur.

Un certain nombre de règles générales peuvent être données pour les différentes étapes de la phase préanalytique afin d'assurer la qualité et d'éviter certaines erreurs préjudiciables à la validation du résultat.

Des règles complémentaires s'appliquent à certaines indications, notamment en cas d'urgence, et de particularités des micro-organismes ou des techniques d'analyses.

### L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

**V.1.1.1 Prescription médicale : la fiche de renseignement**

L'analyse est habituellement demandée dans le but d'établir le diagnostic et de concourir au traitement d'une maladie infectieuse. Le biologiste cherchera à mettre en évidence et à cultiver les agents pathogènes capables de provoquer des manifestations infectieuses particulières. Dans certains cas, l'analyse a pour but de détecter la persistance ou le portage de micro-organismes particuliers en vue de prévenir ou de mesurer leur dissémination à d'autres sujets réceptifs. Telles sont, par exemple, la recherche d'un portage maternel de *Streptococcus agalactiae* dans la prévention d'une infection néonatale, et la détection de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques à risque épidémique. Une modification de la flore microbienne commensale peut être parfois étudiée à l'occasion de protocoles épidémiologiques bien déterminés. L'analyse microbiologique doit être prescrite explicitement sur l'ordonnance, selon la nomenclature des actes de biologie médicale. Le prescripteur, son nom, sa qualité, et la manière de le contacter doivent être clairement identifiés. Il doit mentionner l'identité du malade (nom, prénom, sexe, date de naissance).

Éventuellement son numéro d'identification, une date d'hospitalisation ou de transfert d'un établissement de soins à un autre doivent être précisés, ainsi que tous les renseignements utiles à la qualité de l'analyse et à la validation des résultats.

Ces renseignements concernent notamment le but de l'analyse : diagnostic étiologique d'une infection, choix ou poursuite d'une thérapeutique, suivi sous traitement, contrôle après traitement, ou recherche d'une modification de la flore commensale impliquée dans la prise en charge du malade ou comportant un risque pour son entourage. Le prescripteur doit préciser la recherche de micro-organismes particuliers. Il doit mentionner également la nature des manifestations pathologiques, le site des lésions infectieuses, et leur date d'apparition. Il doit préciser éventuellement l'état physiologique du malade et l'existence d'affections associées, telles que l'intolérance aux produits utilisés pour le prélèvement, une allergie aux antibiotiques, une immunodépression.

Sont utiles à préciser : l'éventualité d'un séjour en pays d'endémie et le risque d'infection ou de colonisation par un agent potentiellement épidémique ou résistant aux agents thérapeutiques : tuberculose, méningococcémie, brucellose, shigellose, hépatite virale... Ces renseignements contribuent au choix des techniques de prélèvement et d'analyse, à la prévention des incidents liés à la nature du prélèvement, ainsi qu'à la limitation des risques de dissémination.

Les traitements qui peuvent interférer avec le choix des techniques de prélèvement (traitement anticoagulant) ou d'analyse (traitement antibiotique) doivent être mentionnés. L'interprétation des résultats tiendra compte des antibiotiques pris avant ou au moment du prélèvement.

Le degré d'urgence de l'exécution du prélèvement avant de débiter un traitement antibiotique est précisé lorsque les résultats vont modifier la conduite du diagnostic ou de la thérapeutique.

**V.1.1.2 La prescription détaillée (ou une fiche de liaison)**

Elle est utile pour coordonner les démarches du prescripteur, du préleveur et du biologiste. Elle peut comporter les rubriques mentionnées plus haut et de la place pour indiquer des situations non envisagées. En effet le choix des techniques microbiologiques les mieux adaptées nécessite que le prescripteur informe le biologiste de la situation du malade et des particularités de chaque prélèvement. Ces éléments sont pris en compte par le biologiste lors de l'interprétation des résultats. La fiche de liaison doit être simple et adaptée aux circonstances rencontrées en pratique quotidienne. Elle doit être confidentielle.

Son esprit est celui d'une collaboration étroite et efficace entre les différents acteurs de l'analyse microbiologique. Cependant, pour éviter la multiplication des "écrits" et la redondance des informations, et pour s'aider des outils informatiques, un (ou plusieurs)

## **Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité**

modèle(s) de prescription d'analyse microbiologique pourrai(ent) être proposé(s). En l'absence de précisions utiles, le biologiste appliquera les techniques correspondant à la recherche systématique des bactéries les plus souvent pathogènes dans un contexte clinique par "défaut".

### **V.1.1.3 L'exécution du prélèvement**

Le prélèvement d'un produit pathologique est un acte clé de la phase pré-analytique. Il existe un très grand nombre de méthodes de prélèvements. Lorsque les lésions infectieuses sont profondes et que leur pronostic est sévère, le prélèvement invasif le plus proche du foyer infectieux et comportant peu de risque de contamination sera le plus approprié. Il pourra être associé à des prélèvements au niveau des portes d'entrée probables et des voies d'excrétion, ainsi qu'à des hémocultures et des recherches de métastases septiques permettant d'apprécier la dissémination de l'infection. Lorsque l'étiologie infectieuse peut être facilement déterminée sur un échantillon prélevé par une méthode non invasive, celle-ci sera privilégiée. Ainsi l'examen cyto-bactériologique des urines est habituellement effectué sur un échantillon du milieu du jet, plutôt que sur le produit d'un prélèvement invasif. Dans tous les cas la méthode de prélèvement doit être signalée, si elle ne correspond pas à la technique usuelle.

#### **V.1.1.3.1 Le préleveur**

Le préleveur habilité doit être clairement identifié. Il respecte les règles de soins et d'hygiène, notamment en ce qui concerne le port de gants, blouses, et dans certains cas de masques ou lunettes de protection. Il est informé des circonstances particulières par l'ordonnance ou la fiche de liaison. Lui-même doit transmettre les indications techniques du prélèvement sur une fiche de renseignements jointe aux échantillons destinés au laboratoire. En cas d'incident survenu lors du prélèvement ou de difficulté préjudiciable à la validité des résultats, le biologiste doit en être informé.

#### **V.1.1.3.2 Le moment du prélèvement**

Un prélèvement à visée étiologique doit être effectué dès le début du processus infectieux. Dans le cas fréquent des infections aiguës communautaires, les échantillons doivent être prélevés avant l'administration d'agents antimicrobiens. En cas d'échec d'un traitement préventif ou curatif institué sans analyse microbiologique préalable, celui-ci doit être interrompu. Si la sévérité de l'évolution ne permet pas l'arrêt des antibiotiques pendant plus de quelques heures ou s'il existe un risque d'infections opportunistes plurimicrobiennes ou successives chez un malade neutropénique ou immunodéprimé, l'antibiothérapie en cours reste justifiée et des modalités techniques particulières peuvent être proposées. L'ensemencement pourra par exemple être pratiqué dans des milieux liquides permettant de diluer les antibiotiques de l'échantillon, ou dans des milieux contenant des inhibiteurs d'antibiotiques.

#### **V.1.1.3.3 Le site du prélèvement**

Les sites anatomiques appropriés sont généralement les plus proches du foyer infectieux initial et des localisations secondaires, ou ceux qui constituent la porte d'entrée, les voies d'excrétion ou d'évacuation de l'infection (fistule, drainage). Il ne convient pas cependant de

## **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

## ***Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité***

prélever les liquides de drainage recueillis dans les collecteurs. En effet les souches isolées seraient alors représentatives des espèces les plus aptes à se multiplier secondairement *in vivo* et non celles des micro-organismes présents dans les lésions profondes.

### **V.1.1.3.4 Une quantité suffisante de matériel est nécessaire pour une analyse complète**

Une trop petite quantité de matériel ne permet pas au laboratoire de réaliser les frottis et les cultures appropriés. Le microbiologiste privilégie alors les techniques permettant la reconnaissance des bactéries les plus souvent en cause. Ceci est particulièrement problématique pour les lésions chroniques contenant un petit nombre de micro-organismes qui risquent de ne pas être détectés à l'examen microscopique d'un frottis, ni même récupérés en culture. Des volumes insuffisants peuvent donc donner lieu à des résultats faussement négatifs. Comme les échantillons de sang, les produits de ponction ou de biopsie contenant une faible quantité de bactéries peuvent être ensemencés directement dans un milieu de culture liquide. Il faut alors réduire au maximum les risques de contamination par des bactéries se multipliant plus rapidement que l'agent pathogène.

### **V.1.1.3.5 Les méthodes de prélèvement**

Elles dépendent des micro-organismes capables d'infecter différents organes ou tissus. Elles dépendent également du type de lésion et de l'enjeu du diagnostic étiologique, en limitant les indications des prélèvements invasifs selon le bénéfice escompté et les risques iatrogènes. Dans tous les cas, les prélèvements seront réalisés avec du matériel stérile à usage unique, selon les règles d'hygiène et d'asepsie appropriées.

Le procédé d'analyse de l'échantillon dépend du type de prélèvement et la valeur des résultats est tributaire de la qualité de l'échantillon. Ainsi l'écouvillonnage est à proscrire à cause du faible volume d'échantillon recueilli et des risques de dessiccation et de contamination. Son usage est limité aux prélèvements des téguments ou des muqueuses. Il est alors recommandé de prélever deux échantillons, afin que l'un soit utilisé pour l'examen microscopique direct et l'autre pour les cultures. Ces échantillons ne peuvent cependant pas remplacer les prélèvements obtenus par ponction, aspiration, biopsie ou chirurgie. Les bactéries intracellulaires doivent être récoltées par "grattage" des muqueuses à l'intérieur desquelles elles se sont développées. Une erreur fréquente est de transmettre au laboratoire de microbiologie uniquement un écouvillon, à partir duquel il sera difficile de pratiquer un nombre suffisant de frottis et de cultures, alors que la totalité du matériel de biopsie ou d'excision chirurgicale a été recueillie dans un fixateur, comme le formol, réservé à l'examen histo-pathologique.

La ponction, le cathétérisme, ou l'abord chirurgical sont indiqués pour les suppurations d'une séreuse, d'un organe creux, d'un tissu ou d'une cavité abcédée. Il est utile de préciser si d'autres échantillons ont été réservés pour des examens cytologiques, histo-pathologiques, immunologiques et biochimiques, ou si la répartition doit être faite au laboratoire. Des constatations morphologiques et histopathologiques, qui contribuent au diagnostic d'une infection, peuvent permettre au microbiologiste de compléter son analyse par des techniques particulières.

Lorsqu'il existe un risque de dissémination et un enjeu vital à isoler la bactérie en cause et à ajuster le traitement, ces prélèvements sont complétés par des hémocultures.

#### **V.1.1.3.6 Contamination des prélèvements**

Des précautions particulières doivent être prises pour éviter la contamination des prélèvements par les bactéries de l'environnement et par une grande variété de micro-organismes commensaux. Ces bactéries ou levures peuvent inhiber la multiplication *in vitro* des bactéries pathogènes et être prises à tort pour des pathogènes opportunistes. Ceci concerne en particulier les infections dont le site est respiratoire, ORL, oculaire, intestinal, génito-urinaire, cutané ou sous cutané, ainsi que les prélèvements de sang pour hémoculture. Il existe, notamment pour les prélèvements respiratoires profonds, ainsi que pour les prélèvements intra-utérins, des brosses ou cathéters télescopiques qui permettent d'atteindre les sites profonds en évitant le contact avec les muqueuses colonisées par la flore endogène.

Le risque de contamination existe pour tous les échantillons prélevés à la surface des téguments ou des muqueuses. Ainsi le matériel recueilli par écouvillonnage de l'orifice d'une fistule a plus de chance de contenir des bactéries commensales non pathogènes que le matériel prélevé en profondeur, par aspiration, curetage ou biopsie. L'aspiration peut être faite au moyen d'un dispositif stérile (cathéter, pipette) introduit dans la fistule ou le long du dispositif de drainage, après décontamination de l'orifice ou de la plaie de surface. Les procédés de décontamination de surface comportent soit le simple rinçage avec du sérum physiologique stérile (recueil d'une expectoration, prélèvement de plaie, d'escarre ou de brûlure), soit l'utilisation sur la peau ou même sur une muqueuse d'une solution antiseptique. L'antiseptique doit être éliminé avec du sérum physiologique stérile, afin de ne pas inhiber la culture des bactéries pathogènes.

Les ponctions et l'abord chirurgical sont les meilleurs procédés de prélèvement pour éviter les contaminations.

#### **V.1.1.3.7 Récipients contenant les échantillons**

Des récipients stériles à usage unique et étanches sont utilisés pour contenir les échantillons. Chaque récipient doit être identifié par une étiquette comportant le nom, le prénom et la date de naissance du malade, ainsi que la date, l'heure, la nature et le site du prélèvement. Le préleveur doit être identifié par son nom ou ses initiales. Le récipient est transporté dans un sac en plastique étanche et fermé hermétiquement, comportant un compartiment pour les papiers et la prescription.

#### **V.1.1.4 Délai de transport et conservation des échantillons**

En règle générale, les bactéries ne résistent pas à la dessiccation et au froid, en particulier lorsque de petits volumes d'échantillons sont prélevés. Les petits échantillons et les biopsies doivent être acheminés en 15 à 30 mn au laboratoire, les autres en moins de 2 heures, afin de préserver la survie des micro-organismes les plus fragiles et d'éviter qu'ils soient inhibés par des bactéries plus résistantes à l'environnement extérieur. Les bactéries qui ne supportent pas de délai peuvent être préservées dans des milieux de transport. Ceux-ci sont couramment utilisés pour des délais de transport de plus de 2 heures.

##### **V.1.1.4.1 Conservation des échantillons**

Pour éviter la dessiccation des échantillons de faible volume, notamment sur écouvillon, ceux-ci peuvent être placés dans des tubes contenant des milieux de transport.

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

La conservation à + 4°C inhibant la multiplication bactérienne est recommandée pour préserver les proportions relatives des différentes espèces quand des cultures semi-quantitatives sont nécessaires à l'interprétation des résultats. Cette mesure est bien adaptée aux urines et aux selles, cependant les shigelles sont très sensibles au froid et nécessitent un ensemencement immédiat.

En revanche elle est controversée pour les échantillons d'origine pulmonaire qui peuvent contenir des bactéries pathogènes fragiles comme *Haemophilus influenzae*. D'autres espèces bactériennes comme *Neisseria meningitidis* et *N. gonorrhoeae* sont particulièrement sensibles au froid. Les échantillons génitaux, oculaires, respiratoires, ou céphalo-rachidiens destinés à la culture des bactéries ne doivent pas être conservés à 4°C.

### V.1.1.4.2 Milieux de transport

Ces milieux sont destinés à la conservation de certains types de micro-organismes et à l'inhibition d'autres organismes de croissance plus rapide. Les milieux de type Stuart conviennent pour la plupart des bactéries, y compris les anaérobies strictes.

D'autres milieux sont nécessaires pour la recherche de certaines bactéries, comme les *Chlamydia*. L'inclusion d'un échantillon dans un milieu de transport empêche l'examen microscopique et l'appréciation de la morphologie des cellules et des bactéries. Si la quantité d'échantillon est suffisante, une partie peut être placée en milieu de transport et une partie conservée dans un tube stérile, contenant ou non un faible volume (0,5 à 2 ml) de sérum physiologique stérile ou de bouillon de culture. Les conditions d'inoculation et de transport de ces milieux doivent être respectées. Même dans les conditions recommandées, la prolongation du délai entre prélèvement et analyse, ainsi que les variations de température, peuvent être préjudiciables à la survie des microorganismes.

La plupart des échantillons sont transportés à la température ambiante, d'autres nécessitent d'être réfrigérés.

### V.1.1.4.3 Transferts d'échantillons

Certaines techniques sont difficiles à maîtriser ou trop coûteuses lorsqu'elles ne sont pas pratiquées quotidiennement. Elles méritent la mise en place d'une organisation permettant l'acheminement rapide des échantillons ou des cultures vers des laboratoires de référence. L'emballage, la signalisation et le transport des échantillons de matériel infectieux doivent être effectués selon des procédures légales nationales et internationales permettant d'assurer la sécurité des personnes et le maintien de la viabilité des micro-organismes à cultiver.

### V.1.1.5 Sécurité

Les précautions dites "universelles" doivent être prises pour tous les prélèvements.

Tout produit pathologique doit être considéré à l'heure actuelle comme potentiellement infectieux.

Toute précaution doit être prise lors des prélèvements et de la manipulation des échantillons pour la protection du personnel, en particulier lorsque le risque infectieux est accru, comme dans le cas d'un micro-organisme très virulent à risque épidémique, ou bien particulièrement résistant aux chimiothérapies anti-infectieuses.

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## **Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité**

Les principales règles de sécurité peuvent être ainsi rappelées La fermeture des récipients doit être hermétique, pour ne pas contaminer l'extérieur des flacons ou des tubes. Les procédures de désinfection adaptées à chaque type de contamination doivent être connues.

Le récipient dont la surface externe a été contaminée peut être placé dans un deuxième récipient ou dans un sac en plastique fermé hermétiquement. La prescription accompagnant le prélèvement doit être alors placée à l'extérieur de cet emballage supplémentaire.

Lorsqu'un récipient fuit, il est préférable de ne pas le manipuler. Lorsqu'il ne peut être placé dans un autre récipient étanche, il faut éviter de le transporter. Il doit être autoclavé et un autre échantillon clinique doit être transmis au laboratoire.

Il ne faut pas transporter une seringue avec son aiguille; celle-ci doit être retirée avec un dispositif de sécurité et la seringue purgée d'air recapuchonnée, puis placée dans un sac en plastique fermé hermétiquement.

### **V.1.1.6 Risques d'erreurs**

Différents types de défauts ou d'erreurs liés aux circonstances mêmes du prélèvement ou aux modalités utilisées peuvent interférer avec la reconnaissance ou l'isolement du micro-organisme responsable de l'infection.

Les exemples comprennent : le traitement antibiotique au moment du prélèvement, l'application locale de produits anesthésiques sur les lésions avant le prélèvement, l'utilisation d'un soluté contenant un antiseptique pour recueillir l'échantillon, le transport ou le stockage impropre des échantillons, ainsi que le choix d'un milieu de transport inapproprié. D'autres facteurs peuvent gêner la recherche de l'agent étiologique ou empêcher d'établir la cause d'une infection. Ce sont notamment :

- les difficultés de prélèvement qui peuvent rendre impossible l'obtention d'un échantillon représentatif du processus infectieux;
- la contamination habituelle par la flore endogène de certains sites de prélèvement;
- la difficulté de distinguer une simple colonisation d'une véritable infection due à des bactéries opportunistes.

C'est pourquoi plus les prélèvements auront été effectués avec précaution, plus grand sera le niveau de confiance attribué aux résultats de la culture.

### **V.1.1.7 Liste des circonstances justifiant un refus d'analyse par le laboratoire**

Elles concernent des conditions de prélèvement, de transport et de conservation préjudiciables à la sécurité de l'analyse et à la validité des résultats.

L'analyse d'échantillons qui risquent de ne pas être représentatifs du processus infectieux peut donner des résultats donnant lieu à des erreurs de diagnostic et à des traitements inappropriés.

Il est particulièrement important d'éviter, par un étiquetage correct des échantillons, les erreurs d'identification du malade et d'analyse à effectuer. Le refus doit être immédiatement signalé au prescripteur et au préleveur, afin qu'un autre échantillon soit adressé au laboratoire.

L'analyse dans la même journée d'un même type de prélèvement est inutile, en dehors du sang pour hémoculture ou par exemple d'un liquide céphalorachidien prélevé du fait de l'évolution d'un syndrome méningé. Si l'analyse d'un échantillon ne donne pas le bénéfice escompté, mieux vaut revoir les possibilités d'obtenir un diagnostic et envisager quels moyens peuvent augmenter les chances d'aboutir : modalités différentes de prélèvement, ou autre site, ou technique d'analyse différente. Le laboratoire recevant un duplicata d'un premier échantillon peut le conserver dans les meilleures conditions et appeler le prescripteur pour envisager avec lui qu'elle peut être une meilleure stratégie pour étayer un diagnostic difficile.

Echantillons qui ne peuvent être acceptés pour analyse microbiologique :

## **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

- échantillons non étiquetés ou improprement étiquetés
- échantillons reçus dans des récipients endommagés et non étanches
- échantillons visiblement contaminés
- échantillons reçus plus de 2 heures après leur prélèvement, sans avoir été conservés dans les conditions recommandées
- échantillons inappropriés aux analyses prescrites
- même type d'échantillon qu'un échantillon reçu le même jour (excepté hémoculture, LCR) .
- \* S'il s'agit d'un prélèvement invasif, l'analyse de l'échantillon peut éventuellement être faite après entretien avec le médecin qui peut identifier l'échantillon qu'il a lui même prélevé.[33]

### V.1.2 La phase analytique : modalités de l'examen bactériologique

#### V.1.2.1 Diagnostic bactériologique des principales infections

##### V.1.2.1.1 Des méningites bactériennes

La méningite infectieuse est une atteinte du système nerveux central limitée aux méninges par opposition à la méningo-encéphalite touchant le parenchyme cérébral. Les méningites infectieuses se répartissent en trois groupes : les méningites virales, généralement bénignes et d'évolution spontanée favorable ; les méningites fongiques, rares et le plus souvent liées à une immunodépression ; et enfin les méningites bactériennes.

Parmi les méningites bactériennes, on distingue :

- les méningites communautaires causées par *N.meningitidis*, *Haemophilus influenzae* sérotype b et *Streptococcus pneumoniae*
- les meningites d'innoculation acquises principalement en cours d'intervention neurochirurgicale causées par des enterobactéries, des bacilles Gram (-) non fermentaires telles que *Pseudomonas aerogenosa*, *acinetobacter baumannii* et des cocci a Gram (+) telles que *staphylococcus aureus*, *staphylocoques a coagulase négative* et streptocoques.

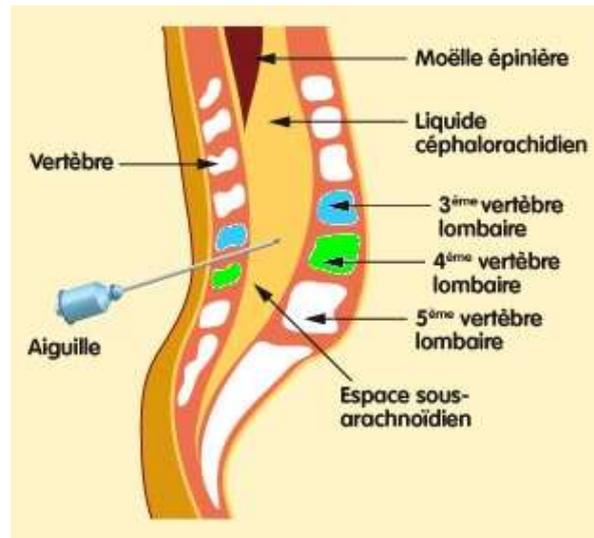
L'élément décisif pour affirmer une méningite repose sur l'examen du liquide céphalorachidien (LCR). Il s'agit toujours d'un examen d'urgence à traiter le plus rapidement possible.

##### V.1.2.1.1.1 Prélèvements de LCR et d'Hémoculture

Le prélèvement de LCR se fait habituellement par ponction lombaire (PL) dans l'espace L4–L5 ou L5–S1.

Exceptionnellement, chez le nouveau-né, le prélèvement peut se faire par ponction transfontanellaire ou par ponction ventriculaire directe.

2ml de LCR sont recueillis dans deux tubes stériles en vue d'analyses biochimiques, cytologiques et bactériologiques. Du fait de l'importance du diagnostic (qui demeure une urgence médicale) et de la fragilité des bactéries à tout écart de température le LCR devra être acheminé rapidement au laboratoire.



**Figure 5 : Ponction lombaire (PL)**

#### V.1.2.1.1.2 Examen microscopique direct

Auparavant, nous devons noter l'aspect du LCR : le LCR normal est limpide « eau de roche ». Différents aspects pathologiques peuvent être observés : eau de riz (ou trouble, à partir d'environ 200 éléments/mm<sup>3</sup>), xanthochromique (présence de protéines), hématique ou hémorragique.

L'Examen microscopique du LCR consiste à pratiquer une numération cellulaire et des colorations (Gram, Bleu de méthylène, MGG)

La numération se fait en cellule de Malassez qui permet d'évaluer le nombre d'éléments nucléés (polynucléaires et lymphocytes) par mm<sup>3</sup>. En dehors de la période néonatale, le LCR a une cellularité comprise entre 3 et 5 éléments/mm<sup>3</sup>. En fonction de l'âge et au-delà de 10 éléments/mm<sup>3</sup>, la formule leucocytaire est établie après cyto-centrifugation et coloration au May-Grünwald-Giemsa.

#### V.1.2.1.1.3 Mise en évidence d'antigènes solubles

La recherche d'antigènes solubles par agglutination de particules de latex sensibilisées permet la mise en évidence des polysaccharides capsulaires de différentes bactéries, libérés dans les liquides biologiques au cours des infections. On peut détecter des antigènes solubles de streptocoque du groupe B, de *Neisseria meningitidis*, d'*Escherichia coli* sérotype K1,

d'*H. influenzae* sérotype b, et de *S. pneumoniae*. À noter que les antigènes capsulaires d'*E. coli* K1 et de *N. meningitidis* B sont identiques.

Une technique immunochromatographique, reposant sur la mise en évidence de polysaccharide C de *S. pneumoniae*, a été récemment développée et apparaît plus sensible (Binax NOW®).

#### V.1.2.1.1.4 Biologie moléculaire

La recherche de gènes spécifiques de certaines bactéries (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, etc.), voire du séro-groupe bactérien ou de virus, peut être effectuée à l'aide de

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

techniques d'amplification génique (PCR) directement réalisées sur le LCR. Ces techniques spécifiques et rapides sont utiles lorsque l'examen direct et les antigènes solubles sont négatifs.

### V.1.2.1.1.5 Etude biochimique du LCR : glycorachie et protéinorachie

La glycorachie est déterminée simultanément à la glycémie, une glycorachie normale étant égale aux deux tiers de la glycémie. Une hypoglycorachie est généralement associée à une méningite bactérienne. Cependant, une hypoglycorachie peut être observée lors de méningites ourliennes, à entérovirus, de chorioméningites lymphocytaires, de méningoencéphalites herpétiques ou à cytomégalovirus (CMV).

-les valeurs de la protéinorachie sont toujours augmentées (supérieur à 1 g/l) alors que les valeurs normales de la protéinorachie sont comprises entre 0,10 et 0,45 g/l, ces valeurs étant cependant plus élevées en période néonatale jusqu'à 2 mois.

Par ailleurs, en cas de suspicion de méningite tuberculeuse (BK), le dosage des chlorures montre une hypochlorurachie (normale : 110–120 meq/l).

### V.1.2.1.1.6 Interprétation des résultats de l'examen cyto-chimique du LCR

• LCR avec prédominance de polynucléaires :

Éléments  $>10/\text{mm}^3$ , avec polynucléaires  $>50$  % Hypoglycorachie et Hyperprotéinorachie : méningite bactérienne probable.

• LCR avec prédominance lymphocytaire

Éléments  $>10/\text{mm}^3$ , avec lymphocytes  $>50$

Si hypoglycorachie : en faveur d'une méningite bactérienne; principalement *Listeria monocytogenes* ou BK si hypochlorurachie

Si normoglycorachie : en faveur d'une méningite virale, confirmée par dosage de l'interféron  $\alpha$  et/ou éventuellement par amplification génique virale.

• LCR panaché

Éléments  $>10/\text{mm}^3$  ; environ 50 % de polynucléaires et de lymphocytes

Protéinorachie et glycorachie normale

En cas de suspicion de méningite virale (en particulier à virus Echo, Coxsackie, oreillons, CMV, VZV [virus de la varicelle et du zona]), de même qu'en cas d'encéphalite herpétique, il y a augmentation de l'interféron  $\alpha$  du LCR au début des signes cliniques (normale  $<2$  UI). Ce dosage est principalement réalisé par méthode biologique (culture cellulaire). Le dosage de l'interféron  $\alpha$  doit être interprété en fonction du titre sérique, une atteinte virale méningée montrant une concentration plus élevée dans le LCR que dans le sérum.

### V.1.2.1.1.7 Mise en culture de prélèvement

Quel que soit le nombre d'éléments, le LCR estensemencé sur milieux de cultures adaptés aux bactéries recherchées : gélose au sang frais, gélose au sang cuit, milieux sélectifs pour isolement des bacilles Gram négatif (milieu hektoen)

Le LCR est égalementensemencé sur gélose chocolat Isovitalex® et sur gélose Columbia au sang incubées deux jours à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>, complétée par l'ensemencement d'un bouillon cœur-cerveille. Ces deux milieux sont incubés 5 jours à 37 °C.

En cas de présence de germes à l'examen direct (Gram), la morphologie, permet d'orienter le diagnostic.

#### Cas particuliers

• Patients immunodéprimés : en cas de suspicion de cryptococcose méningée, on recherche le cryptocoque par examen direct à l'encre de Chine. De plus, les ensemencements de la gélose

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

chocolat Isovitalex® et du bouillon cœur-cerveille sont complétés par la mise en culture du LCR sur gélose Sabouraud. Le plus souvent, dans les cryptococcoses méningées, le LCR est lymphocytaire et normoglycorachique.

- Suspicion clinique de tuberculose avec localisation méningée : l'ensemencement sur milieux traditionnels est complété par la mise en culture sur géloses Löwenstein et Coletsos.
- Selon les données cliniques, une recherche de leptospire peut être entreprise. Dans ce contexte, le LCR est normoglycorachique et montre une hypercellularité lymphocytaire.

### V.1.2.1.1.8 Identification bactérienne

Les bactéries isolées font l'objet d'une identification allant jusqu'au sérotype ou sérotype pour *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *L. monocytogenes* et *S. pneumoniae*. En cas de méningite méningococcique (risque d'épidémie), la prophylaxie des sujets contacts consiste à prescrire un antibiotique (spiramycine ou rifampicine) et un vaccin approprié. C'est une maladie à déclaration obligatoire (MDO).

### V.1.2.1.1.9 Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Repose sur l'antibiogramme standard, sur la détermination des CMI pour *S. pneumoniae* et *N. meningitidis* et *Haemophilus influenzae b*.

Pour les méningites à *S. pneumoniae* et à *N. meningitidis*, les CMI de la pénicilline G, de l'amoxicilline et du céfotaxime ou de la ceftriaxone sont donc primordiales à déterminer pour adapter le traitement antibiotique. [7]

### V.1.2.1.2 Examen cyto bactériologique des urines (ECBU)

L'infection du tractus urinaire (ITU) se caractérise par la multiplication de micro-organismes au sein de l'arbre urinaire (bactériurie) s'accompagnant d'une réaction inflammatoire avec afflux de leucocytes dans l'urine ou leucocyturie. L'ITU se fait quasi exclusivement par voie ascendante et les bactéries responsables d'ITU sont presque toujours d'origine digestive. L'appareil urinaire est normalement stérile, bien que s'ouvrant vers l'extérieur, et la présence de bactéries dans l'urine suffirait donc à définir l'ITU. Mais l'urine est contaminée physiologiquement lors de son émission par les germes du méat et du tiers inférieur de l'urètre ou du périnée. Aussi, l'ECBU se caractérise par une analyse quantitative de la culture de l'urine associée à une analyse quantitative de la leucocyturie. En outre, l'urine constitue un bon milieu de culture.

Aussi, la réalisation et le transport du prélèvement doivent répondre à des règles strictes qui conditionnent l'interprétation de cet examen.

#### V.1.2.1.2.1 Prélèvement

Le mode de prélèvement idéal des urines est la ponction vésicale sus-pubienne (PSP) qui permet d'éviter toute contamination par la flore de l'urètre. Toutefois, cette technique est trop invasive pour être utilisée en première intention. En pratique, le recueil d'urine se fait le plus souvent chez l'adulte coopératif par voie naturelle selon la technique dite du « milieu de jet » et selon des règles strictes qui conditionnent la qualité de l'ECBU.

\*Sujet adulte coopératif et enfant avec miction volontaire :

Les urines sont recueillies de préférence le matin après lavage soigneux des organes génitaux externes avec une solution antiseptique ou un savon doux, et rinçage soigneux à l'eau. Chez une femme qui présente des pertes, même minimales, la mise en place d'une protection vaginale est indispensable.

La première partie de la miction sera rejetée, permettant d'éliminer tout ou partie de la flore commensale de l'urètre inférieur, et seul le milieu du jet sera recueilli dans un flacon stérile.

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## *Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité*

### \*Chez le petit enfant sans miction volontaire :

Après un nettoyage soigneux de la région périnéale, un sac plastique collecteur sera fixé au moyen d'un adhésif.

Ce sac ne doit pas être laissé plus de 30 minutes. Au-delà de ce temps, on place un nouveau sac après avoir recommencé le nettoyage.

### \*Chez les porteurs de sonde à demeure :

Le tuyau d'évacuation sera clampé pendant 10 minutes afin de laisser l'urine s'accumuler en amont, puis l'urine sera ponctionnée via l'opercule spécifique de la sonde après désinfection à l'alcool iodé.

#### **V.1.2.1.2.2 Acheminement**

Afin d'éviter toute prolifération bactérienne, le transport au laboratoire se fera en moins de 2 heures. Au-delà de ce délai, le flacon d'urine sera placé dans un récipient contenant de la glace (les urines pourront être gardées 24 heures à 4 °C, en sachant toutefois que la réfrigération ne préserve pas les leucocytes). En l'absence de système de prévention de prolifération bactérienne, on pourra utiliser la technique de la lame immergée ensemencée, au lit du malade par l'infirmière. Lame et flacon seront tous deux adressés au laboratoire.

#### **V.1.2.1.2.3 Renseignements accompagnant le prélèvement**

Ces renseignements sont indispensables car ils permettront au microbiologiste d'optimiser l'ECBU et son interprétation. Ils concernent l'âge et le sexe du patient, le mode et l'heure du prélèvement, les motifs de la demande, les antécédents d'ITU, la notion de maladie concomitante, le traitement éventuellement déjà institué.

#### **V.1.2.1.2.4 Techniques d'analyse au laboratoire**

Les urines sont normalement jaune claires et doivent être limpides. L'émission d'urines troubles suggère une infection urinaire, mais n'est cependant pas spécifique ; elle peut être liée à la présence de cristaux, de médicaments, etc.

#### **V.1.2.1.2.5 Examen microscopique direct**

##### Détermination de la leucocyturie

Par le compte d'Addis technique de choix pour détecter une leucocyturie anormale est la mesure du taux d'excrétion des leucocytes ou compte d'Addis. Le sujet, au repos, vide sa vessie puis absorbe un grand verre d'eau. On recueille les urines des 3 heures suivantes. Le compte d'Addis représente le nombre d'éléments par millilitre multiplié par le volume de la diurèse en millilitre, pendant 3 heures divisé par 180 minutes. Normalement, il y a moins de 5 000 leucocytes/minutes, et moins de 5 000 hématies/minutes. Toutefois, en raison de la lourdeur de sa réalisation, le compte d'Addis (ou hématies leucocytes minute) reste réservé à la surveillance des néphropathies interstitielles.

En pratique, la numération des leucocytes se fait dans un hématimètre (cellule de Nageotte ou Malassez) dans un volume de 1 mm<sup>3</sup>. Une urine normale contient moins de 10 leucocytes par mm<sup>3</sup>. Les cellules ne sont pas toutes d'origine vésicale. L'identification des cellules est possible : polynucleaires, hématies, cellule épithéliales, cristaux, cylindres (normale, hématique, leucocytaire), cellule rénale et candida sp.



**Figure 6 :** cellule de Malassez

#### V.1.2.1.2.6 Autres analyses

L'examen microscopique de l'état frais permet de mettre en évidence la présence:

- de cylindres : les cylindres ont pour origine la lumière tubulaire rénale. Ils peuvent être hyalins et sont alors principalement composés de la protéine de Tamm-Horsfall qui est une défensive de l'arbre urinaire. Ces cylindres sont physiologiques. Les cylindres pathologiques contiennent des hématies et/ou des leucocytes (cylindres hématiques et/ou leucocytaires). Leur présence permet d'identifier le rein comme la source de l'hématurie et/ou de la leucocyturie ;
- de cristaux médicamenteux, d'oxalate de calcium, d'acide urique, phospho-ammoniacomagnésien. Ces derniers signent la présence d'une lithiase secondaire à une infection liée à une bactérie productrice d'uréase (notamment *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium urealyticum*) et qui provoque une alcalinisation des urines ;
- de levures, *Trichomonas* , spermatozoïdes, oeufs de parasites ( *Schistosoma haematobium* ) ou bactéries.

#### V.1.2.1.2.7 Examen direct après coloration

L'examen direct, après coloration de Gram, d'une urine non centrifugée ne présente une sensibilité proche de 100 % que pour des concentrations bactériennes  $> 10^5$  UFC/ml . Malgré une sensibilité médiocre, cet examen reste indispensable en apportant des informations immédiates au clinicien sur le type de bactéries impliquées ou la présence de levures permettant d'adapter le traitement. En cas de présence d'une flore polymorphe, l'examen direct permettra d'évoquer une contamination du prélèvement et de faire aussitôt pratiquer une autre analyse. De plus, dans certains cas, notamment lors de culture stérile avec examen direct positif, il permettra d'adapter les milieux de culture, l'atmosphère et le temps d'incubation.

#### V.1.2.1.2.8 Bandelettes réactives chimiques

Ces bandelettes permettent de détecter simultanément et rapidement la présence de leucocytes et de bactéries sur des urines fraîchement émises.

Les leucocytes sont mis en évidence grâce à la détection d'une leucocyte estérase provenant à la fois des leucocytes intacts et des leucocytes lysés. Le seuil de détection est d'environ 10 leucocytes par  $\text{mm}^3$ . Des faux positifs sont possibles en cas de contamination par la flore vaginale ou de présence de *Trichomonas* . La sensibilité du test est diminuée en cas de forte glycosurie ou protéinurie, ou en présence d'acide borique, d'acide ascorbique ou d'acide oxalique. Enfin, les céphalosporines de 1re génération et les tétracyclines peuvent provoquer des faux négatifs.

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

Les bactéries produisant une nitrate réductase sont détectées par la recherche de nitrites. La principale limite de ce test est qu'il ne peut détecter que les entérobactéries (toutes productrices de nitrate réductase) et non les bactéries à Gram positif telles que les entérocoques et les staphylocoques. Le seuil de détection est de  $10^5$  UFC/ml.

Toutefois, ce seuil n'est atteint que si les urines ont séjourné suffisamment longtemps dans la vessie (> 4 heures) pour permettre aux bactéries de convertir suffisamment de nitrates en nitrites pour être détectées. En pratique, il est recommandé de tester les urines du matin.

L'association des deux tests pour la détection des infections urinaires permet de palier les défauts de sensibilité de chacun. Ainsi, l'absence simultanée de nitrites et de leucocyte estérase présente une très bonne valeur prédictive négative chez l'adulte ou le grand enfant sans facteur de risque associé. Une « bandelette négative » chez un patient sans facteur de risque associé permet d'éliminer raisonnablement le diagnostic d'infection urinaire et de ne pas réaliser un ECBU.

Notons enfin que la performance du test de la bandelette dépend du respect strict des temps de lecture. Dans le but de standardiser cette lecture, elle peut être réalisée par des petits automates. Ces derniers présentent l'avantage, en plus, d'éditer un résultat sur papier qui permet d'avoir une trace écrite du résultat dans le dossier du patient.

### V.1.2.1.2.9 Mise en culture :(Uroculture quantitative et qualitative)

#### Choix des milieux

La très grande majorité des bactéries responsables d'infections urinaires ne sont pas exigeantes et sont cultivées sur géloses ordinaires.

-Milieux non chromogènes :

Initialement, les milieux les plus usuels étaient adaptés à la croissance des entérobactéries avec le plus souvent un indicateur de l'attaque du lactose permettant une différenciation des colonies. Les milieux les plus utilisés étaient soit non sélectifs – le milieu de CLED, et milieu lactosé au bromocrésol pourpre –, soit sélectifs – le milieu de MacConkey. L'utilisation d'un milieu sélectif pour les bactéries à Gram négatif rendait impératif l'ensemencement d'une gélose adaptée aux bactéries à Gram positif telle qu'une gélose au sang avec ou sans inhibiteurs type acide nalidixique plus colimycine.

-Milieux chromogènes :

Le principe du milieu chromogène est d'utiliser des substrats synthétiques qui sont des analogues structuraux d'une molécule naturellement clivée par une enzyme caractéristique d'une espèce bactérienne ou d'un groupe d'espèces bactériennes. Le substrat clivé acquiert des propriétés chromogéniques et précipite en colorant la colonie sans diffuser dans la gélose. La plupart permettent une très bonne différenciation des colonies et une identification présomptive de la, ou des espèces bactériennes présentes dans l'urine. Aujourd'hui, les milieux chromogènes, bien que plus onéreux, ont largement supplanté les milieux non chromogènes en raison de plusieurs avantages. Ces milieux permettent une discrimination plus fine des colonies et donc une meilleure sensibilité de détection des urines polymicrobiennes. Ils permettent une identification directe d' *E. coli* , *Enterococcus* spp. et de *Proteus mirabilis* , à l'aide de tests complémentaires simples (indole, état frais) permettant un rendu d'identification plus rapide au clinicien et une éventuelle adaptation de l'antibiothérapie probabiliste. Ils permettent une économie substantielle en réactifs et en temps-technicien.

Il est à noter toutefois que, dans de rares cas, ce système d'identification peut être pris en défaut. Ainsi, par exemple, de rares souches de *Citrobacter freundii* indologènes dépourvues de  $\beta$ -D-glucosidases peuvent être identifiées à tort comme *E. coli*. Par ailleurs, quelques souches d' *Enterobacter* spp. et de *Citrobacter* spp. ont été décrites avec un phénotype de  $\beta$ -D-glucuronidase. Le microbiologiste, notamment en milieu hospitalier, du fait de la plus grande diversité des entérobactéries rencontrées, devra donc rester vigilant et bien contrôler

### L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

l'adéquation entre l'identification et l'antibiogramme. Un autre risque est représenté par la possibilité de confondre un entérocoque et un streptocoque du groupe B qui peut être responsable d'infection urinaire chez la femme enceinte ou le nouveau-né. Chez ces patients, l'utilisation en parallèle d'une gélose au sang apparaît souhaitable.

-Autres milieux :

D'autres milieux seront utilisés en fonction du contexte clinique ou en fonction du Gram :

- en cas de suspicion de tuberculose, la recherche de *M. tuberculosis* sera réalisée sur les milieux adéquats
- en cas de cystite hémorragique chez des patients immunodéprimés, on recherchera *Corynebacterium urealyticum* en ensemençant une gélose au sang et en prolongeant l'incubation au-delà de 24 heures ;
- en présence de bactéries à Gram positif à l'examen direct, une gélose au sang sera systématiquement ensemencée ;
- en présence de germes à l'examen direct et en l'absence de culture en 24 heures, une recherche d'anaérobies et de germes exigeants sera réalisée en ensemençant une gélose au sang incubée en anaérobiose durant 48 heures et une gélose « chocolat » sous CO<sub>2</sub> durant 48 heures ;
- en présence de levures, un milieu Sabouraud ou un milieu chromogène pour levures (permettant l'identification présomptive de *C. albicans* notamment) sera ensemencé et incubé à 30 °C.



**Figure :** Exemples d'uroculture quantitative sur milieu chromogène.

A) 10<sup>6</sup> UFC/ml de *Klebsiella pneumoniae* et de *Proteus mirabilis* .

B) 10<sup>5</sup> UFC/ml d' *Escherichia coli* .

C) 10<sup>4</sup> UFC/ml d' *Escherichia coli* et de streptocoque du groupe D.

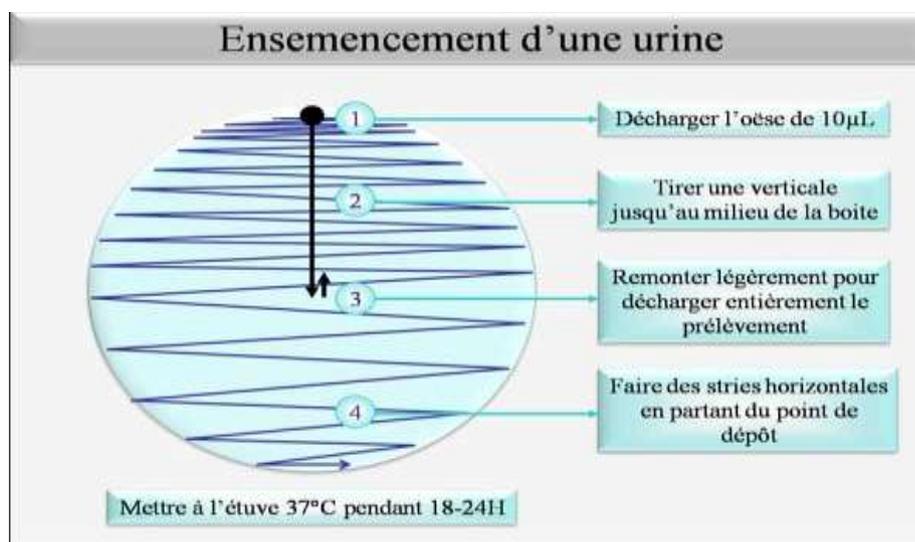
### V.1.2.1.2.10 Modes d'ensemencement

L'ensemencement doit répondre au double but de dénombrer les bactéries et d'isoler la ou les bactéries en cause en obtenant des colonies bien distinctes les unes des autres.

- Méthode originale de Kass : on fait des dilutions en série de 10 en 10. Un volume connu de chaque dilution est étalé sur une boîte de Pétri.
- Méthode simplifiée de Véron : l'urine est diluée au 1/100 en eau distillée stérile. On étale 0,1 ml de cette dilution. Une colonie correspond à 1 000 bactéries par millilitre.
- Méthode de l'anse calibrée : cette méthode est actuellement la plus utilisée. L'urine est prélevée à l'aide d'une anse de 10 µl et ensemencée selon une méthode standardisée qui permet, grâce à un abaque, de convertir l'aspect de la culture en UFC/ml, et ce sans dénombrement. Cette méthode simple, sans dilution préalable, permet une numération de 10<sup>3</sup> à 10<sup>6</sup> UFC/ml tout en permettant l'obtention de colonies isolées.

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

• Méthode de la lame immergée : on plonge dans l'urine fraîchement émise une lame portant des milieux nutritifs, généralement MacConkey et CLED. Cette méthode permet l'ensemencement des urines au lit du malade. Toutefois, elle présente le désavantage de ne pas obtenir des colonies isolées pour des concentrations de  $10^6$  bactéries par ml et donc nécessite souvent le réensemencement en isolement de l'urine en cas d'infection.



**Figure 8 :**Ensemencement d'une urine

### V.1.2.1.2.11 Appareils et méthodes automatiques

Différents automates ont été mis au point pour détecter les bactériuries significatives. Ces automates permettent de cribler rapidement (< 1/2 heure) les urines et de déterminer les échantillons qui seront alors ensemencés.

Différentes technologies ont été développées. La microscopie à flux couplée soit à un système d'analyse d'image (IRIS iQ200®), soit un système de marquage fluorescent (Sysmex UF-100®, bioMérieux UF-500i, UF-1000i) permet non seulement le compte des bactéries, mais aussi celui des leucocytes, des hématies et la détection de cristaux, de levures. La technologie de l'automate Cellenium-160US® repose sur l'utilisation d'une sonde fluorescente marquant l'ensemble des bactéries qui sont détectées et dénombrées par un microscope à fluorescence. Le Coral UTI Screen system® repose sur la quantification de l'ATP bactérien par fixation sur la luciférine et émission de lumière après action de la luciférase. Tous ces automates ont l'inconvénient d'être chers et ne peuvent être utilisés que par les laboratoires traitant plusieurs centaines d'échantillons d'urines par jour. Les échantillons détectés positifs doivent être secondairement ensemencés.

### V.1.2.1.2.12 Incubation des urocultures

La majorité des bactéries des infections urinaires poussent en 18 à 24 heures et, en dehors de contextes particuliers, il n'y a pas lieu de prolonger l'incubation. Dans certains cas, bactéries exigeantes, déficientes, ou culture négative, malgré la présence de bactéries à l'examen direct, il faut savoir modifier le milieu de culture (gélose au sang ou « chocolat »), et l'atmosphère (anaérobie et  $CO_2$ ), et prolonger l'incubation.

### V.1.2.1.2.13 Interprétation des urocultures

Interprétation de la bactériurie quantitative sur échantillons obtenus par la technique du « milieu de jet » :

Les critères de Kass qui servent historiquement de référence pour l'interprétation de la bactériurie sont les suivants :

- bactériurie  $< 10^4$  /ml : bactériurie non significative (contaminants) ;
- bactériurie  $> 10^5$  /ml : bactériurie significative.

Il reste une zone d'incertitude entre  $10^4 - 10^5$  UFC/ml.

Ces critères ont été établis dans le cadre d'études réalisées chez des patientes présentant une pyélonéphrite ou une bactériurie asymptomatique. Toutefois, Stamm et al ont montré, en réalisant une étude chez des femmes présentant une cystite, qu'une observance stricte des critères de Kass pouvait entraîner le rejet à tort de diagnostic d'ITU pour près de 50 % des cas. Dans cette étude, le taux de bactériurie seuil permettant d'inclure 95 % des cystites était de  $10^3$  UFC/ml. En outre, de nombreux facteurs affectent le comptage des bactéries (infection débutante, mictions nombreuses et répétées, pH acide urinaire, urée augmentée, localisation prostatique, etc.).

En conséquence, il est admis que, sous respect strict des conditions de prélèvement, de transport et d'analyse des urines, toute bactériurie  $> 10^3$  UFC/ml est à prendre en considération. Le bactériologiste devra tenir compte, pour l'interprétation et la poursuite de l'analyse, de l'aspect monomicrobien ou polymicrobien de la culture, de la leucocyturie, du contexte clinique et des ECBU faits antérieurement ainsi que du type de micro-organisme retrouvé. Un groupe de microbiologistes européens a proposé un classement en catégories des germes retrouvés en culture dans les ECBU en fonction de leur niveau d'implication dans l'étiologie des infections urinaires :

- un premier groupe pouvant être considéré comme pathogène lorsque les germes sont isolés, même en petites quantités, ( $10^3$  UFC/ml) : *Escherichia coli* et *Staphylococcus saprophyticus*
- un deuxième groupe, plus habituellement impliqué dans le cadre des infections urinaires nosocomiales, lorsqu'il existe des facteurs anatomiques ou iatrogènes favorisants et pour lequel un taux de  $10^4$  UFC/ml peut être proposé : *Proteae Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus spp* et *Staphylococcus aureus* ;
- un troisième groupe, dont l'implication comme pathogène exige un niveau de bactériurie  $> 10^5$  UFC/ml. Ce groupe comprend des espèces à Gram positif ( *Streptococcus agalactiae* , les staphylocoques à coagulase négative autres que *Staphylococcus saprophyticus* ), à Gram négatif ( *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* , autres *Pseudomonaceae* ) ou les *Candida spp.*;
- un quatrième groupe comprenant les espèces considérées comme contaminantes qui appartiennent habituellement à la flore urétrale ou génitale de proximité : lactobacilles, streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques, *Gardnerella vaginalis*, *Bifidobacterium spp.*, bacilles diphtérimorphes (sauf *Corynebacterium urealyticum*) . Seul leur isolement à partir d'une ponction sus-pubienne peut permettre d'évoquer leur rôle pathogène.

Interprétation de la bactériurie quantitative sur échantillons obtenus par une technique différente de celle du « milieu de jet » :

Les taux de bactériurie significatifs varient selon le mode de prélèvement. Il est à noter que, pour la ponction sus-pubienne, le taux est de 10 UFC/ml et nécessite donc l'ensemencement d'un volume minimal de 100  $\mu$ l.

-Cas particulier de la bactériurie asymptomatique :

La bactériurie asymptomatique se définit comme la présence de bactéries dans l'urine à un taux significatif en dehors de tout signe d'infection urinaire.

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

La bactériurie asymptomatique peut survenir avec ou sans leucocyturie. La fréquence de la bactériurie chez la femme jeune est inférieure à 1 %, mais des fréquences de plus de 10 % peuvent être observées chez les patients de plus de 80 ans, les diabétiques, les patients ayant une vessie neurologique, les hémodialysés, et les patients sondés de façon intermittente ou à demeure. Toutefois, la recherche de bactériurie asymptomatique systématique n'est reconnue comme apportant un bénéfice réel que dans deux contextes cliniques particuliers.

Au cours de la grossesse, la bactériurie asymptomatique représente un risque accru de survenue de pyélonéphrite et d'accouchement prématuré et doit être systématiquement recherchée par la réalisation d'une uroculture au cours du premier trimestre. En prévision d'une intervention sur les voies urinaires et notamment d'une résection transurétrale de la prostate ou de l'ablation d'une sonde JJ, une bactériurie asymptomatique sera systématiquement recherchée et traitée afin de prévenir un risque accru de sepsis .

### Interprétations des discordances entre leucocyturie et bactériurie :

Dans un certain nombre de cas, le microbiologiste et le clinicien peuvent être confrontés à une discordance entre la leucocyturie et la bactériurie.

#### **V.1.2.1.2.14 Identification et antibiogramme**

Une identification sera réalisée pour les bactéries non identifiées par le milieu chromogène. L'antibiogramme est effectué en parallèle en testant les antibiotiques qui ont une bonne élimination urinaire, en particulier : $\beta$ -lactamines, quinolones et fluoroquinolones, cotrimoxazole, aminosides, fosfomycine.

Après obtention de l'identification, les résultats définitifs devront être accompagnés de commentaires. Clairement rédigés, ils devront dans certains cas susciter le dialogue avec le clinicien. Certaines remarques sont fréquentes :

- concernant le mode de prélèvement, en cas de souillure, il faut rappeler les règles strictes du prélèvement ;
- l'ECBU est un des rares examens bactériologiques répétitifs; en cas d'interprétations litigieuses, il convient de demander un nouvel ECBU ;
- des bactéries telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, signent une ITU iatrogène ;
- parfois, l'antibiogramme n'est fourni qu'à titre indicatif; il faut alors souligner que ce n'est pas une incitation à l'antibiothérapie. [6]

#### **V.1.2.1.3 Analyse bactériologique des selles**

De nombreuses bactéries sont incriminées dans l'étiologie des diarrhées infectieuses aiguës. Certaines d'entre elles ont un pouvoir entéropathogène bien établi (*Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., etc.). D'autres bactéries sont devenues pathogènes après acquisition de facteurs de virulence. C'est le cas en particulier d' *Escherichia coli*, espèce représentant 80 % de la flore intestinale aérobie de l'homme. *E. coli* est à la fois une bactérie commensale et une bactérie entéropathogène par l'expression de facteurs de virulence acquis et/ou constitutifs. Ainsi, un pouvoir entéropathogène est actuellement reconnu pour six pathovars d' *E. coli* :

- Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) sont responsables de diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement et de la diarrhée du voyageur.
- Les *E. coli* entéro-invasifs (EIEC) sont responsables de dysenteries proches de la shigellose.
- Les *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) sont retrouvés au cours des colites hémorragiques et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) typique.
- Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont la cause de diarrhées infantiles persistantes souvent épidémiques dans les pays en voies de développement.

## **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

– Les *E. coli* à adhésion diffuse ( *diffusely-adhering E. coli* [DAEC ] ) et les *E. coli* entéroagrégatifs (EAggEC ) sont à l'origine de diarrhées aqueuses persistantes chez l'enfant. Le but essentiel de la coproculture est de rechercher, parmi une flore commensale très abondante, des bactéries habituellement absentes et réputées pour leur pouvoir pathogène. On peut également, en plus de la recherche de ces bactéries, mettre en évidence des toxines ou des gènes codant pour les toxines dans les selles ( *Clostridium difficile* , EHEC ).

Les recherches sont fonction des différents contextes cliniques :

- adulte ou enfant de plus de 2 ans et contexte par défaut :
  - réalisation d'une coproculture standard comprenant la recherche de *Salmonella* spp., de *Shigella* spp. Et de *Campylobacter* spp. (voire *Yersinia enterocolitica* si le sujet est diarrhéique).
- enfant de moins de 2 ans :
  - réalisation d'une coproculture standard en sachant que l'étiologie virale prédomine dans cette tranche d'âge.
- contextes cliniques particuliers :
  - notion de voyage récent en « pays tropical » ;
  - malade sous traitement antibiotique ;
  - toxi-infection alimentaire collective (TIAC) ;
  - patients infectés par le VIH ;
  - syndrome hémolytique et urémique (SHU) ;
  - intoxication alimentaire ;
  - syndrome cholériforme ;
  - détection de colonisation par des bactéries multirésistantes (BMR) ;
  - détection de portage chez le personnel de restauration ( *Staphylococcus aureus* , *Salmonella* ).

### V.1.2.1.3.1 Prélèvements

La coproculture se pratique sur selles liquides, molles, glaireuses ou hémorragiques, ou sur indications très précises sur des selles solides.

À partir de matières fécales émises dans un récipient propre, la valeur de quelques grammes de selles est prélevée à l'aide d'une spatule ou du flacon cuillère et introduite dans un flacon stérile. Un fragment purulent muqueux ou sanglant est choisi lorsqu'il en existe.

Un écouvillonnage rectal est parfois indiqué, notamment chez le nourrisson et l'enfant.

La conservation se fera à +4 °C et ne devra pas dépasser 12 heures. Certaines bactéries doivent être recherchées systématiquement (le plus couramment : *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* et *Campylobacter* ) et d'autres ne le sont que sur demandes spécifiques dans un contexte particulier (EHEC, *C. difficile*, *V. cholerae* , etc.).

Chez un malade atteint d'un épisode aigu de diarrhée, deux ou trois prélèvements peuvent être nécessaires.

L'aspect des selles sera toujours noté et guidera le choix des milieux de cultures.

### V.1.2.1.3.2 Examen microscopique

L'examen direct à l'état frais permet de déceler la présence de leucocytes et d'hématies dans les selles (éventuellement de parasites). Il est possible si les selles sont diarrhéiques ou afécales.

L'examen du frottis après coloration de Gram permet d'apprécier l'importance et l'équilibre de la flore entre les bactéries à Gram positif et Gram négatif. Une flore équilibrée est composée

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

majoritairement de bacilles à Gram négatif, mais toujours avec présence de bacilles à Gram positif. Toute perturbation notable de cet équilibre doit être signalée. Le mode opératoire est le suivant :

- selle solide : dilution de la selle au 1/10 e dans de l'eau distillée, bien agiter au vortex, faire un étalement de la suspension sur lame et colorer ;
- selle liquide : déposer directement une goutte de selle sur lame et colorer.

### V.1.2.1.3.3 Ensemencement

Des milieux sélectifs d'isolement et des milieux d'enrichissement sont utilisés en fonction du contexte clinique.

La recherche de salmonelle et shigelle doit être systématique. Différents milieux sélectifs sont commercialisés: gélose *Salmonella Shigella* (SS), gélose Hektoen, etc.

Les milieux sont incubés 24 heures à 37 °C. Pour la recherche de *Salmonella* , on ensemence un milieu d'enrichissement au sélénite – milieu de Leifson– ou au tétrathionate (milieu de Mueller-Kauffmann) avec 0,5 ml de selle. Il est important de les repiquer de préférence après 3 à 6 heures au maximum d'incubation à 37 °C afin d'éviter la multiplication des bactéries commensales mal inhibées au-delà de ce délai.

Le mode opératoire est le suivant :

- dilution de la selle au 1/10 e dans de l'eau distillée ;
- ensemercer systématiquement :
  - une goutte de la dilution en quadrant sur un milieu pour recherche de salmonelle, shigelle (Hektoen, SS, milieux chromogènes) ;
  - une goutte de la dilution en bouillon Mueller-Kauffman (pour l'enrichissement en salmonelle).
- ensemercer en plus :
  - un milieu de Karmali pour la recherche de *Campylobacter* ;
  - selles sanglantes :
    - un milieu MacConkey Sorbitol pour la recherche d' *E. coli* O157 et conserver la selle pour recherche de *Shiga like* toxines ;
    - un milieu sélectif pour *Yersinia* ;
    - un milieu sélectif pour rechercher *Clostridium difficile* et recherche de la toxine de *C. difficile* en immunochromatographie ;
    - un milieu de Sabouraud : si présence de levures à l'examen direct ;
    - en cas de suspicion de choléra : ensemercer un milieu spécial alcalin TCBS ou GNAB après enrichissement en eau peptonée alcaline à 1 % du NaCl pendant 6 h à 37 °C pour la recherche du vibron.

\*Recherche de salmonelles et shigelles

L'orientation s'effectue selon l' aspect des colonies :

- sur milieu Hektoen après 24 heures à 37 °C, les colonies suspectes sont H<sub>2</sub>S + et lactose – ;
- sur la gélose SS, la présence de colonies incolores ou faiblement colorées avec ou sans centre noir est une forte présomption de *Salmonella* ou de *Shigella* ;
- sur les milieux chromogènes, la détection spécifique de l'estérase des *Salmonella* donne une coloration des colonies variant du rose au mauve.

On repère au moins cinq colonies suspectes isolées.

La recherche de l'uréase (milieu urée-indole) est faite sur chaque colonie suspecte :

- éliminer les colonies de *Proteus* : uréase + (milieu urée-indole rouge en 2 heures) ;
- ensemercer avec les autres colonies à partir du milieu urée-indole une galerie d'identification (API 20 E® ou galerie automatisée) et un antibiogramme d'entérobactéries ;
- ensemercer les colonies suspectes sur milieu deKligler-Hajna.

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

Devant les caractères biochimiques présomptifs, auxquels on ajoute pour les *Salmonella* le caractère ONPG, on tente une première agglutination sur la culture en milieu de Kligler-Hajna avec un sérum polyvalent anti-*Salmonella* (OMA, OMB, etc.) ou anti-*Shigella*. Si cette agglutination est positive, elle permet de donner au clinicien un diagnostic présomptif qui ne peut être définitif qu'après l'identification biochimique détaillée. Il existe en effet des communautés antigéniques, notamment entre *Salmonella*, *Enterobacter hafniae* et *Citrobacter*.

L'identification définitive se fait par les caractères biochimiques et l'étude de la formule antigénique. Un test présomptif des salmonelles consiste en la lyse par les bactériophages spécifiques (phage *Salmonella* 01 de Felix et Callow ; Biorad) est pratiqué sur une gélose Mueller-Hinton en déposant une microgoutte d'une suspension phagique. À partir de la 5<sup>e</sup> heure d'incubation à 37 °C, on peut déjà voir une plage de lyse au niveau du dépôt de la goutte. Le diagnostic différentiel se pose essentiellement entre *Shigella* et *Alkalescens dispar* que l'on différencie par l'alcalinisation en 2 à 3 jours du citrate de Christensen et la présence d'une lysine décarboxylase. Génétiquement, les *Shigella* sont des *E. coli*, immobiles, auxotrophes, adaptés à l'homme et porteurs d'un plasmide d'invasivité. L'isolement et l'identification des *Shigella* sp. sont donc délicats.

### V.1.2.1.3.4 Diagnostic différentiel du genre *Shigella*

*Shigella* est à la fois immobile, non gazogène (sauf variété de *S. flexneri* G), H<sub>2</sub>S, uréase, LDC, ONPG, citrate Simmons, citrate de Christensen et acétate de Trabulsi négatifs.

#### Identification antigénique des *Shigella*

- Utiliser une culture en milieu solide non inhibiteur. Faire les agglutinations de préférence à partir des colonies réensemencées sur milieu de Kligler-Hajna.
- Effectuer les agglutinations à l'aide des réactifs Bio-Rad.

\*Recherche de *Campylobacter* spp :

Leur recherche doit être systématiquement réalisée chez les enfants et pour les adultes sur demande spéciale ou en présence de selles liquides. La culture se fait sur un milieu spécifique (milieu Karmali, de Skirrow ou de Buztler) en 24 à 48 heures à 37°C en atmosphère microaérophile.

### V.1.2.1.3.5 Examen direct

L'observation microscopique directe de selles diarrhéiques au microscope à contraste de phase peut permettre un diagnostic avec présence de bactéries présentant une mobilité caractéristique en « vol de mouette ».

L'examen après coloration de Gram met en évidence des petits bacilles à Gram négatif incurvés.

#### Aspect des colonies

On repère après 48 heures d'incubation les colonies suspectes.

Selon l'humidité du milieu, on retrouve de petites colonies grisâtres convexes à bords réguliers ou des colonies plates muqueuses de forme irrégulière.

- *C. fetus*, colonies petites, rondes, transparentes.
- *C. jejuni*, colonies grises, humides, plates et qui ont tendance à s'étaler après 48 heures d'incubation à 37 °C.

Les caractères suivants sont recherchés :

- oxydase + ;
- très mobiles en « vol de mouette » ;
- test à l'hippurate : à partir d'une culture riche sur gélose chocolat Isovitalex® :  
– suspension laiteuse dans 0,25 ml de NaCl + un disque d'hippurate :

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

- incuber 4 heures à 37 °C ;
- lecture : ajouter 5 gouttes de ninhydrine ;
- réincuber 10 à 15 minutes (au maximum) à 37 °C ;
- test + : bleu foncé ;
- test – : incolore, jaune léger, bleu très clair.

\*Recherche de *Clostridium difficile* :

*Clostridium difficile*, bacille à Gram positif anaérobie strict, est à l'origine de colites pseudomembraneuses ou de diarrhées postantibiotiques. Cet agent est majoritairement impliqué dans les diarrhées nosocomiales, en particulier chez l'adulte. Le portage digestif asymptomatique de *C. difficile* est estimé à 3 % dans la population adulte, mais il peut atteindre 15 à 25 % des sujets après un traitement antibiotique ou un séjour dans une unité à forte endémicité. En revanche, un taux de portage élevé est habituellement observé chez les jeunes enfants : 50 à 70 % des enfants de moins de 2 ans sont colonisés.

Les deux facteurs principaux de virulence sont la toxine A et la toxine B. Ce sont des exoprotéines de grande taille.

La toxine A est nommée entérotoxine, car fortement entérotoxique; elle possède également une activité cytotoxique. La toxine B ou cytotoxine est mille fois plus puissante que la A.

Ces toxines inactivent des protéines régulatrices du cytosquelette d'actine (monoglycosylation des protéines Rho).

Les souches non toxigènes sont considérées comme non virulentes.

Le diagnostic bactériologique repose sur la recherche des toxines. En parallèle, la culture de *C. difficile* est recommandée.

On retiendra qu'il s'agit d'un examen demandé spécifiquement dans un contexte clinique particulier (diarrhée nosocomiale, prise d'antibiotiques, immuno-déprimé).

### V.1.2.1.3.6 Mise en évidence des toxines

La grande majorité des souches produisent simultanément les toxines A et B. Leur mise en évidence directement à partir des selles est un excellent marqueur de la présence d'une souche toxigène de *C. difficile*.

La méthode de référence consiste à rechercher un effet cytopathogène (ECP) de la toxine B par culture cellulaire. Cette méthode présente une excellente sensibilité, n'est pas standardisée et nécessite une infrastructure lourde, avec un délai de réponse de plusieurs jours.

Des tests immuno-enzymatiques ou immunochromatographiques ont été développés. Ils détectent soit la toxine A seule, soit les toxines A et B au moyen d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux.. Les tests unitaires rapides permettent de rendre un résultat en moins de 30 minutes. En ce qui concerne les techniques de biologie moléculaire, des trousse de PCR en temps réel sont actuellement commercialisées et permettent le dépistage des deux gènes codant les toxines (*tcdA*, *tcdB*).

### V.1.2.1.3.7 Culture et mise en évidence de la bactérie dans les selles

Le diagnostic rapide par recherche d'antigène dans les selles est effectué par la mise en évidence de la glutamate déshydrogénase par agglutination ou par méthode immuno-enzymatique, couplés au dépistage de la toxine A, ces tests présentent une valeur prédictive négative de plus de 99 % Concernant l'isolement de *C. difficile* par culture, cette dernière est effectuée dans des conditions d'anaérobiose stricte (sachet individuel ou jarre) sur milieux sélectifs contenant de la cyclosérine et de la céfoxitine comme le milieu TCCA (gélose coeur-cerveau + 5 % de sang de cheval, 0,1 % de taurocholate, 250 mg/l de cyclosérine et 10 mg/l de céfoxitine). Les subcultures peuvent être effectuées sur gélose au sang ou milieu de Wilkins-Chalgren.

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

Après 48 heures d'incubation en anaérobiose à 37 °C, les colonies présentent les caractéristiques suivantes :

- colonies à bords irréguliers (3 à 5 mm), non hémolytiques, présentant un aspect de verre fritté à la loupe binoculaire ;
- odeur caractéristique de crottin de cheval (libération de crésol) ;
- colonies fluorescentes sous ultraviolet (mais dépend du milieu utilisé).

L'identification se fait à l'aide de galeries biochimiques. L'identification peut également se faire par un test d'agglutination avec un latex sensibilisé par des anticorps antiglutamate déshydrogénase (GDH).

La culture seule ne permet pas de dire si la souche est toxigène ou non. Il est donc recommandé de déterminer le pouvoir toxigène de la souche isolée ; cette méthode s'appelle la culture toxigénique. La détermination du pouvoir toxigène de la souche peut se faire par PCR à partir des colonies, par le test de cytotoxicité ou par les méthodes immuno-enzymatiques à partir du surnageant d'un bouillon de culture de la souche (après 3 jours environ pour atteindre une production maximale de toxine).

### \*Mise en évidence des *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) :

Il était classique de rechercher, en plus des bactéries responsables de diarrhées, les EPEC, dans les selles liquides de nourrissons présentant un tableau de fièvre avec déshydratation. Le rôle de ces bactéries est actuellement discuté. Dans cette tranche d'âge, les causes principales restent d'origine virale : *Rotavirus*, *Adenovirus* .

La procédure d'identification consiste en une agglutination sur lame des colonies en présence de sérums qui doit apparaître en moins de 5 secondes et présenter un caractère massif.

### \*Mise en évidence des *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) :

Les EHEC sont responsables de cas sporadiques ou d'épidémies de diarrhées souvent sanglantes pouvant évoluer vers des pathologies plus graves, le syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT).

Le diagnostic des infections à EHEC est difficile, ces bactéries étant rapidement éliminées du tube digestif. De plus, la quantité présente dans les selles reste très faible, surtout au moment de l'apparition du SHU . Le recueil des selles doit s'effectuer au maximum 4 à 6 jours après le début des prodromes digestifs.

Le diagnostic repose d'une part sur la mise en évidence des EHEC dans les selles par des méthodes phénotypiques et biochimiques, et d'autre part sur la détection des gènes de virulence par des méthodes moléculaires. Il est indispensable de réaliser un enrichissement des selles en eau peptonée pendant 4 à 6 heures à 37 °C. Il existe également un diagnostic sérologique reposant sur l'augmentation du titre sérique des anticorps spécifiques antilipoplysaccharides( LP S).

### \*Mise en évidence des autres pathovars d' *Escherichia coli* :

La détection des autres pathovars responsables de diarrhées reste du domaine des laboratoires spécialisés. Initialement fondée sur le pouvoir pathogène chez l'animal ou l'effet cytopathogène en culture cellulaire, l'identification de ces souches est actuellement réalisée par des techniques de biologie moléculaire .

### \*Recherche de germes multirésistants aux antibiotiques :

Chez les malades hospitalisés dans des services à risque (réanimation, oncologie, etc.), la détection de colonisation par des bactéries multirésistantes aux antibiotiques est effectuée dans les selles des patients à l'aide de milieux chromogènes contenant des antibiotiques pour les entérocoques résistants à la vancomycine et les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE).

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

### V.1.2.1.3.8 Analyse semi-quantitative des selles

En milieu spécialisé (réanimation, grands prématurés et patients immunodéprimés), peut être réalisée une analyse semi-quantitative de la flore fécale afin de prévenir le risque éventuel de septicémie par translocation endogène. [27]

### V.1.2.1.4 Hémoculture

L'hémoculture consiste à mettre en culture du sang circulant qui est normalement stérile, afin de pouvoir rapidement détecter et identifier l'agent infectieux responsable d'une bactériémie. Actuellement, trois types de bactériémies peuvent être distingués :

- transitoires : qui correspondent à des décharges brèves de bactéries dans le sang, sans manifestations cliniques et spontanément résolutive ;
- continues : qui correspondent à des décharges continues qui se rencontrent notamment lors d'endocardites ou en cas de brucellose ou de fièvre typhoïde ;
- intermittentes : qui correspondent à des décharges bactériennes répétées à la suite d'infections diverses.

Qu'elles soient continues ou intermittentes, les bactériémies constituent toujours un état grave et redouté.

Les bactériémies associées à de nombreux états infectieux résultent de décharges de bactéries à partir d'un foyer initial qui peut être d'accès difficile ou de localisation inconnue. Une fois entrée dans la circulation sanguine, la bactérie est susceptible de se propager et de s'installer dans d'autres sites.

L'hémoculture constitue un moyen simple de diagnostiquer une bactériémie. Ainsi, des hémocultures sont systématiquement effectuées devant tout signe faisant supposer un syndrome infectieux (agression microbienne caractérisée par une réponse inflammatoire due à la présence de micro-organismes ou à leur passage à l'intérieur de tissus habituellement stériles) accompagné d'un état septicémique. La septicémie associe deux entités cliniques différentes, une bactériémie prolongée et un état infectieux qui peut aller du sepsis simple à l'état de choc septique. Un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) est la réponse à une agression grave (pas forcément infectieuse) de la part de l'organisme et est défini par la présence d'au moins deux des signes suivants :

- température  $> 38\text{ °C}$  ou  $< 36\text{ °C}$
- fréquence cardiaque  $> 90/\text{min}$
- fréquence respiratoire  $> 20/\text{min}$  ou  $\text{PaCO}_2 > 32\text{ mmHg}$
- leucocytose  $> 12\ 000$  ou  $< 4000/\text{mm}^3$  ou présence de plus de 10 % de polynucléaires immatures. Le sepsis correspond à un SRIS dû à une infection. En revanche, le sepsis sévère est un sepsis associé à une ou des hypoperfusion(s) d'organe(s) se traduisant par une acidose métabolique et/ou une hypoxémie ( $\text{PaO}_2 < 75\text{ mmHg}$  ou  $\text{PaO}_2 < 250\text{ mmHg}$ ) et/ou une oligurie ( $< 0,5\text{ ml/kg/h}$  ou  $< 100\text{ ml/3 h}$ ) et/ou une thrombopénie ( $< 100\ 000/\text{mm}^3$  ou  $\text{TP} < 50\%$ ) et/ou une encéphalopathie.

Enfin, le choc septique est un sepsis sévère associé à une hypotension artérielle malgré une expansion volémique adéquate et/ou la prise d'agents inotropes et/ou vasopresseurs.

#### V.1.2.1.4.1 Vitalité des corps bactériens dans les flacons d'hémocultures

Dans les flacons d'hémocultures, les bactéries peuvent se retrouver sous plusieurs formes :

- intactes : soit sous forme libre dans le plasma, en phase de multiplication active et les bactéries vont alors continuer à se multiplier ; soit sous forme libre mais en phase de repos.

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

Elles ne commenceront alors à se développer qu'à la fin de cette phase de latence correspondant à leur adaptation au milieu nutritif du flacon ;

- lésées ou masquées : dans la circulation sanguine, divers systèmes permettent l'élimination des bactéries tels que le système anticorps-complément ou les polynucléaires et les monocytes qui vont phagocyter les bactéries, ou la présence d'antibiotiques qui vont léser les bactéries. Dans ces deux dernières situations, la culture peut être obtenue après une lyse des cellules ou bien une neutralisation du ou des antibiotiques ;
- cadavres : elles ne sont plus cultivables, mais certains de leurs constituants restent détectables (ADN, antigènes, toxines, etc.).

### V.1.2.1.4.2 Milieux d'hémocultures

Que l'on ait recours à des hémocultures surveillées de manière manuelle ou automatisée, on ensemeince généralement deux flacons pour chaque prélèvement, un flacon aérobie et un flacon anaérobie. Puisque l'isolement de bactéries anaérobies dans les hémocultures est en constante diminution, l'opportunité du flacon anaérobie pourrait être discutée, sauf lors de suspicion d'infections à point de départ gynécologique, oto-rhino-laryngologique ou colorectal. Cependant, certaines souches de streptocoques et d'entérocoques ont une croissance facilitée par une atmosphère anaérobie et de nombreuses bactéries aéro-anaérobies, voire aérobies strictes (*Pseudomonas aeruginosa* en présence de nitrates) peuvent cultiver en anaérobiose. Enfin, le principal gain tient au fait que l'ensemencement du flacon anaérobie double le volume de sang mis en culture

### V.1.2.1.4.3 Nature du milieu

Actuellement, trois milieux sont utilisés comme base :

- coeur-cerveille pour les flacons SA® (aérobies) et SN® (anaérobies) dépourvus de charbon de l'automate BacT/ALERT® (bioMérieux) ;
- trypticase soja pour les flacons FA® (aérobies) et FN® (anaérobies) comportant du charbon de l'automate BacT/ALERT® (bioMérieux), les flacons BD Bactec® des automates Bactec® (Becton Dickinson) ainsi que pour les flacons manuels Signal® (Oxoid) ;
- bouillon à base de peptones pour les flacons manuels Hémoline® de bioMérieux ainsi que pour les flacons VersaTREK REDOX® de l'automate VersaTREK® (Trek Diagnostic System) commercialisé par la société i2A.

Tous ces milieux sont supplémentés avec des nutriments et des facteurs de croissances (vitamines, hémine, hydrates de carbone, cystéine, etc.) permettant la culture des micro-organismes retrouvés en pathologie humaine.

### V.1.2.1.4.4 Conditions physicochimiques et additifs présents dans les milieux

Quels que soient les systèmes et les flacons utilisés, on joue sur plusieurs facteurs.

#### Pression

Les flacons utilisés pour les hémocultures sont fabriqués sous pression réduite (sous vide) permettant un ensemencement direct du flacon au travers d'un opercule.

#### Atmosphère

La plupart des flacons commercialisés comportent une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> afin de favoriser la culture des germes exigeant une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> tels que *Brucella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus* et *Campylobacter*, ce CO<sub>2</sub> constituant un facteur de croissance ou un facteur de départ pour de nombreuses espèces. En général, l'atmosphère des différents flacons est constituée de gaz tels que CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> pour les flacons aérobies et CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub> pour les flacons anaérobies.

#### Anticoagulant

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

Le polyanéthol sulfonate de sodium (SPS) est l'anticoagulant le plus couramment utilisé dans les bouillons d'hémocultures. Selon les fabricants, sa concentration peut varier de 0,0125 à 0,05 %. Le SPS possède des activités inhibitrices vis-à-vis de l'activité bactéricide du sérum, de la phagocytose cellulaire, du complément, du lysozyme, ainsi que sur certains antibiotiques tels que les aminosides. Toutefois, une concentration trop importante de SPS peut inhiber la culture de certaines souches de *Neisseria* spp., de *Peptostreptococcus anaerobius* ou de *Streptobacillus moniliformis*.

### Neutralisation des antibiotiques

Pour certains flacons d'hémocultures, les fabricants ajoutent soit des résines adsorbantes de cations (Bactec®), soit du charbon activé (BacT/ALERT®), substances qui auraient un effet neutralisant sur les antibiotiques. Même si l'activité neutralisante de ces substances est revendiquée par les fabricants, les rares publications sur le sujet sont contradictoires. Il est à noter que bioMérieux annonce la sortie de nouveaux flacons avec de la résine fin 2011, début 2012. De toute manière, si le patient reçoit des antibiotiques, il est toujours conseillé de pratiquer le prélèvement à la « vallée », c'est-à-dire juste avant réadministration des antibiotiques, moment où leurs concentrations sanguines sont les plus faibles, ou après avoir pratiqué une « fenêtre thérapeutique ».

Les résines interviendraient aussi dans la lyse cellulaire, permettant la libération des bactéries intracellulaires. Il faut savoir que l'examen direct des flacons positifs comportant du charbon ou des résines est rendu plus difficile que celui des flacons classiques.



**Figure 9:** Flacons d'hémocultures présents sur le marché.

A) Gamme de flacons pour les Bactecs® (Becton Dickinson). B) Gamme de flacons pour le BacT/ALERT® (bioMérieux).

C) Flacon manuel Signal® (Oxoid) équipé de son indicateur de croissance. D) Gamme de flacons pour le VersaTREK®

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

(Trek Diagnostic System). E) Flacon manuel Hémoline® (bioMérieux). F) Système Isolator® (Oxoid).

### V.1.2.1.4.5 Prélèvements

En milieu hospitalier, les hémocultures sont les prélèvements les plus fréquemment prescrits. Ainsi, à titre indicatif, Toute fièvre inexplicée, survenant particulièrement chez une femme enceinte ou chez un sujet immunodéprimé, accompagnée ou non de signes cliniques évocateurs d'infection, de SRIS ou de sepsis, donne lieu à la prescription d'hémocultures. Il est à noter que chaque patient peut développer un sepsis, mais que les patients dont les défenses locales sont altérées – rupture de la barrière cutanée par exemple – deviennent à risque ; de même, ceux dont le système immunitaire est déficient sont à haut risque.

#### Mode de prélèvement

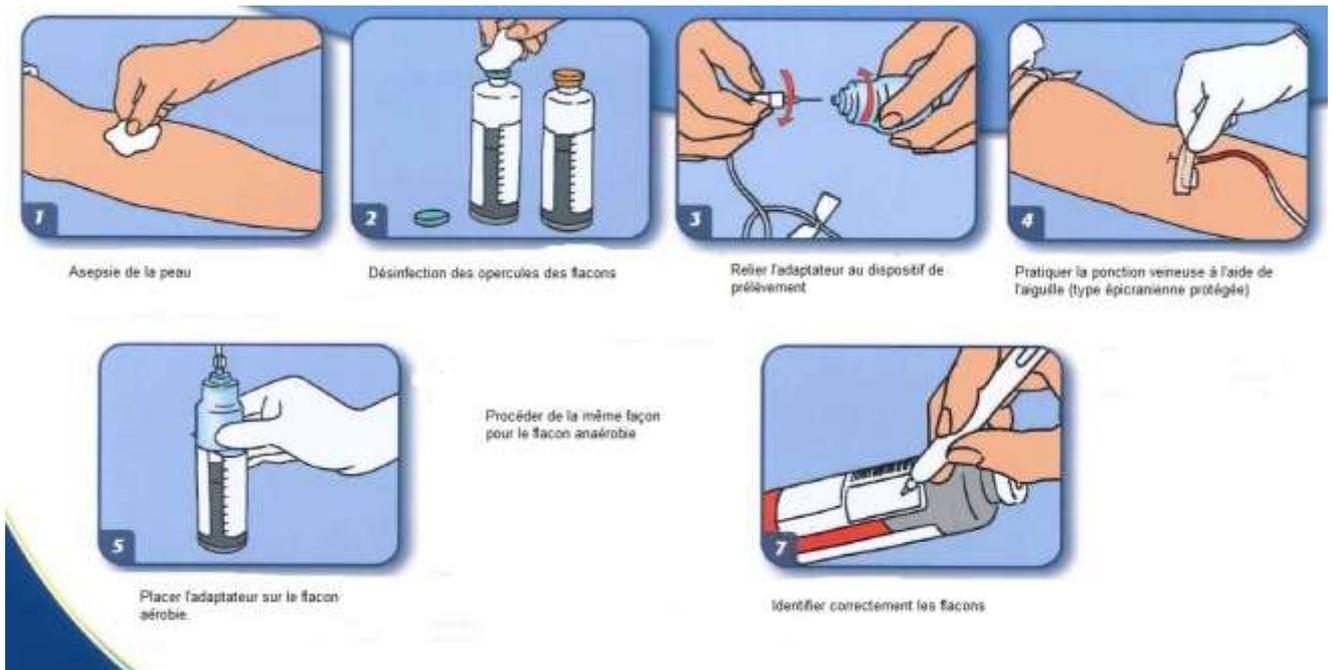
Le prélèvement doit être réalisé après une asepsie rigoureuse. Toute contamination par des germes cutanés ou ambiants peut compromettre la culture de la bactérienne cherchée et/ou gêner l'interprétation du résultat. De plus, tout prélèvement sanguin est associé à un risque non négligeable d'accident d'exposition au sang (AES) , De ce fait, pour tout établissement de santé, le protocole de prélèvement doit être strict et validé par le Comité de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN) local.

Le port de gants est indispensable mais, au préalable, le préleveur doit impérativement se laver les mains avec une solution hydroalcoolique. L'asepsie de la peau du patient au point de ponction doit se faire de manière centrifuge successivement avec de l'alcool à 70 °C puis avec un produit iodé comme la polyvidone iodée. Après la ponction, le produit iodé, potentiellement irritant, est enlevé avec de l'alcool à 70 °C. Le bouchon du flacon d'hémoculture est désinfecté soigneusement avec de la polyvidone iodée ou de l'alcool à 70 °C. Le système de prélèvement est généralement constitué d'une tubulure munie à chaque extrémité d'une aiguille, l'une servant à pratiquer la ponction veineuse, et l'autre l'inoculation du flacon grâce à un adaptateur. Le matériel de ponction est de plus en plus sécurisé pour limiter le risque d'accident d'exposition au sang. Le flacon aérobique est préférentiellement ensemencé en premier, permettant ainsi d'évacuer l'air présent dans la tubulure avant d'inoculer le flacon anaérobique. La ponction veineuse constitue la méthode de prélèvement habituelle des hémocultures, les autres sites de ponction, cathéters veineux ou artériels par exemple, augmentant la fréquence des contaminants.

Cependant, il faut bien garder à l'esprit que la peau possède une flore bactérienne où l'on retrouve principalement des staphylocoques et apparentés ( *Staphylococcus epidermidis* , *S. saprophyticus* , *Micrococcus* , etc.) et des corynébactéries aérobies et anaérobies. Le nombre de bactéries cutanées est estimé entre  $10^2$  et  $10^5$  par  $cm^2$  , d'où l'importance d'une asepsie rigoureuse avant le prélèvement pour éviter tout risque de contamination des flacons par ces germes.

Afin de minimiser encore plus ce risque de contamination, certaines équipes préconisent maintenant d'éliminer le premier millilitre prélevé.

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité



**Figure 10 :** Procédure de prélèvement direct des flacons d'hémocultures

### Quand prélever ?

Pour éviter tout faux négatif, il est impératif de pratiquer le prélèvement le plus tôt possible au cours de la maladie et surtout avant toute mise en route d'antibiothérapie.

Dans le cas contraire, une fenêtre thérapeutique de 48 à 72 heures est recommandée. À l'exception des infections du système vasculaire où la bactériémie est continue, le moment du prélèvement est important car la bactériémie est discontinue, ce qui peut modifier la qualité du prélèvement. Les signes évocateurs sont très variés, notamment en fonction du foyer initial ; toutefois, on peut retrouver :

- des fièvres prolongées et inexplicables ou évoluant par pics, signant la présence de bactéries dans le sang ;
- une hypothermie, notamment pour des septicémies à cocci ou bacilles à Gram négatif témoignant d'un état infectieux sévère ;
- la survenue de frissons, de marbrures ou de sueurs ;
- une splénomégalie ;
- une suspicion d'endocardite ;
- tout signe traduisant un trouble de la coagulation sanguine, tel un purpura.

Actuellement, certaines hémocultures sont tout de même réalisées sur cathéters ou sur sites implantables chez des patients recevant des chimiothérapies lourdes par ces dispositifs, afin de permettre de déceler toute septicémie avec comme point de départ le dispositif. Des hémocultures par ponction veineuse sont effectuées en parallèle. Les délais de positivité des deux hémocultures réalisées en parallèle et au même moment sont alors comparés.

En effet, une précocité d'au moins 120 minutes en faveur de l'hémoculture sur dispositif par rapport à l'hémoculture périphérique signe un dispositif infecté qui pourrait être à l'origine de la septicémie.

Le retrait du dispositif est alors fortement recommandé lorsque l'état général du patient le permet.

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

Il est à noter que dans certaines circonstances (sujet âgé, immunodépression, traitement par des corticoïdes), nous pouvons être en présence d'une septicémie en l'absence de toute fièvre.

### Nombre et volume

Deux à trois hémocultures par 24 heures, espacées de 30 à 60 minutes, sont généralement suffisantes pour isoler le germe responsable de la bactériémie. Un grand nombre de prélèvements exposant à une augmentation du risque de contamination, il est recommandé de ne pas dépasser 3 hémocultures par 24 heures.

La densité bactérienne au cours des bactériémies est généralement faible chez l'adulte, de 1 à 10 UFC/ml. Le recueil d'un volume suffisant de sang est donc nécessaire pour augmenter les chances d'isolement, mais un ratio sang/bouillon doit être respecté car une dilution au 1/10 e , voire au 1/5 e , permet d'inactiver l'effet bactéricide du sérum et de diluer les antibiotiques éventuels. Chez l'adulte, un volume de 10 ml constitue donc un minimum et un doublement du volume (20 ml) augmente de 30 % la positivité des prélèvements. Chez le nourrisson et l'enfant, la densité bactérienne étant plus élevée (souvent supérieure à 1000 UFC/ml), un volume de 1 à 2 ml est suffisant.

### **V.1.2.1.4.6 Acheminement**

Les hémocultures doivent être acheminées le plus rapidement possible au laboratoire afin d'être introduites dans l'automate le plus tôt possible. Chaque hémoculture doit être étiquetée correctement et accompagnée d'une demande sur laquelle figureront : nom, prénom et date de naissance du patient ; le service d'origine ; la date, l'heure et le mode de prélèvement (veineux direct ou sur cathéter ou autre dispositif) ainsi que la température du patient au moment où il est effectué, sans oublier de mentionner une éventuelle antibiothérapie et la nature de celle-ci.

### **V.1.2.1.4.7 Incubation des flacons**

Une incubation à 35 °C pendant 7 jours est recommandée pour les systèmes manuels. La lecture est visuelle et doit être réalisée deux fois par jour au cours des 48 premières heures puis seulement une fois par jour pour les 5 jours suivants. L'observateur va rechercher la présence d'un trouble du milieu provoqué par la croissance bactérienne (bacilles à Gram négatif aérobies, *Staphylococcus* spp. Et *Bacteroides* spp.), d'une hémolyse ( *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. , *Listeria monocytogenes* , *Clostridium* spp. et *Bacillus* spp.), d'un coagulum ( *Staphylococcus aureus* ), de colonies au fond du flacon ( *Streptococcus* spp. et *Nocardia* spp.), de production de gaz (bactéries aéro-anaérobies facultatives et anaérobies strictes) ou la présence de colonies sur les géloses. Certains genres bactériens comme *Brucella* , *Haemophilus* , *Neisseria* et *Campylobacter* troublent peu ou pas le bouillon de culture, l'usage d'un flacon biphasique s'avérant alors utile.

Pour les systèmes automatisés, une incubation de 5 jours suffit. Au-delà de ce délai, les bactéries détectées sont généralement des contaminants qui étaient en très faible quantité.

La prolongation de l'incubation autrefois recommandée pour des micro-organismes particuliers comme les bactéries du groupe HACEK ( *Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus* , *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis* , *Eikenella corrodens* et le genre *Kingella* ) et *Brucella* spp. , ou lorsqu'une endocardite est soupçonnée, n'est plus d'actualité du fait de la sensibilité actuelle des systèmes automatisés.

La lecture par réflectométrie, par fluorescence ou par détecteur de variation de pression toutes les 10 minutes à la recherche du CO<sub>2</sub> produit dans les flacons permet d'obtenir une représentation graphique au cours du temps.

Un flacon sera alors détecté positif si sa production de CO<sub>2</sub> augmente au cours du temps de façon exponentielle .

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

### V.1.2.1.4.8 Traitement des flacons ensemencés

Devant toute suspicion de positivité, un examen microscopique et une mise en culture sont réalisés sur les flacons. Tout flacon considéré comme positif doit impérativement être manipulé sous un poste de sécurité microbiologique, avec enceinte à flux laminaire (au minimum classe 100) et du matériel à usage unique.

### V.1.2.1.4.9 Examen microscopique

Sous un poste de sécurité microbiologique, du bouillon est prélevé de façon aseptique après avoir désinfecté l'opercule du flacon à l'aide d'une seringue et du dispositif fourni par le fabricant. L'examen du bouillon est effectué en deux étapes :

- état frais afin d'observer la morphologie et la mobilité des bactéries ;
- coloration de Gram pour déterminer plus précisément la morphologie des bactéries, cocci ou bacille, et leur affinité tinctoriale, caractère à Gram positif ou négatif. Pour certains germes, on peut avoir recours à d'autres colorations (bleu de méthylène, acridine orange, etc.).

Tout résultat positif de l'examen direct doit être communiqué rapidement au clinicien, notamment si plusieurs flacons sont positifs, si l'examen direct est évocateur de *Clostridium* ou de *Neisseria*, ou si les patients sont à risque (immunodéprimés, apasiques, tableaux de choc, etc.). L'examen direct, morphologie et Gram, peut être trompeur et l'orientation initiale pourra être corrigée lors de l'examen direct des repiquages.

### V.1.2.1.4.10 Ensemencement

Les repiquages des flacons suspects sont effectués en fonction de l'examen direct. Les cultures étant généralement monomicrobiennes, des milieux gélosés non sélectifs seront utilisés : géloses Colombia avec 5 % de sang incubées en aérobose pendant 48 heures et en anaérobiose pendant 5 jours, géloses au sang cuit enrichies (Polyvitex®) placées sous CO<sub>2</sub> pendant 48 heures lorsqu'un *Haemophilus* spp. ou une *Neisseria* spp. sont évoqués.

Si à l'examen direct un mélange de bactéries est suspecté, des milieux sélectifs pourront alors être utilisés, la gélose ANC (acide nalidixique-colistine) pour isoler sélectivement les bactéries à Gram positif et la gélose CLED (cystine-lactose-électrolyte déficient) pour les bacilles à Gram négatif. Le choix de l'atmosphère (aérobose, CO<sub>2</sub> ou anaérobiose) pour l'incubation de ces milieux à 37 °C dépend du diagnostic présomptif.

Les flacons sont conservés à température ambiante pour un éventuel nouveau repiquage ultérieur si les cultures sont restées négatives.

De plus, sur des hémocultures monomicrobiennes, il est possible, à partir d'un culot lavé, de réaliser directement un antibiogramme, soit manuellement, soit à l'aide d'une galerie ou d'un automate en fonction de l'équipement du laboratoire. Suivant le type bactérien observé à la coloration de Gram, une identification sera parallèlement lancée. Les résultats n'auront alors de valeur que si l'isolement observé le lendemain est bien monomicrobien.

Dans le cas contraire, à partir des colonies des repiquages, seront pratiqués un examen direct et quelques tests biochimiques rapides, permettant d'orienter vers une identification complète (galerie, biotypages/sérogroupe, etc.) et d'étudier la sensibilité aux antibiotiques de la ou des souche(s) isolée(s).

Afin de gagner du temps lorsque l'on suspecte *S. pneumoniae*, une recherche d'antigène soluble peut être réalisée directement sur le surnageant du flacon d'hémoculture à l'aide du kit Now® *Streptococcus pneumoniae* de chez Binax.

Dernièrement, l'identification par la technique de spectrométrie de masse a connu un essor et plusieurs études montrent de bonnes sensibilité et spécificité de cette technique pour l'identification du germe directement à partir d'un flacon positif.

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

Enfin, certains fabricants proposent différentes solutions de biologie moléculaire pour l'identification directement à partir d'un flacon positif :

- extraction et identification de *S. aureus* avec recherche en parallèle de la méticillino-résistance à l'aide du kit Xpert® MRSA/SA BC (Cepheid) utilisé sur l'appareil GeneXpert® (Cepheid) lorsqu'à la coloration de Gram on retrouve des cocci à Gram positif en amas ;
- extraction suivie d'une *polymerase chain reaction* (PCR) et d'une hybridation sur bande de nitrocellulose avec les kits Genotype BC® Gram négatif ou Gram positif suivant l'examen direct du flacon positif, ces kits permettant ainsi l'identification de différents germes ainsi que la recherche de gènes de résistance *mecA* et *van* .

### V.1.2.1.4.11 Interprétation

#### Hémocultures positives

Alors que, dans les années 1990, le rapport bactéries à Gram négatif/bactéries à Gram positif isolées des hémocultures tendait à s'équilibrer, nous avons assisté à une modification de ce rapport ces dernières années, voyant les bactéries à Gram positif revenir en tête. Ce changement est dû à une augmentation d'hémocultures positives à staphylocoques à coagulase négative du fait du nombre important de patients porteurs de cathéters intravasculaires. Parmi les agents retrouvés dans les hémocultures positives, les espèces les plus fréquemment isolées actuellement sont *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négative. Parmi les germes à Gram négatif, on retrouve d'autres espèces de la famille des entérobactéries ( *Klebsiella pneumoniae* , *Enterobacter cloacae* , *Serratia marcescens* et *Proteus mirabilis* ), *Pseudomonas aeruginosa* et, parmi les Gram positifs, streptocoques et entérocoques sont retrouvés dans des proportions variables selon les établissements et les services. En revanche, la fréquence d'isolement des bactéries anaérobies reste faible, en général inférieure à 3 % depuis plus de 10 ans.

L'interprétation des hémocultures positives est simple si le même germe est retrouvé à partir de plusieurs prélèvements et si la clinique est évocatrice. De plus, lorsqu'un pathogène spécifique ( *Brucella* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* , groupe HACEK, *Pasteurella* spp., *Campylobacter* spp., *Bacteroides* spp. et éléments fongiques) est retrouvé, même à partir d'une seule hémoculture positive, l'étiologie de l'infection ne fait aucun doute. En revanche, lorsqu'un germe commensal est isolé sur les deux flacons d'une seule hémoculture ou à partir d'un seul flacon, le bactériologiste doit tenter de faire une distinction entre souillure et véritable infection.

Cette interprétation est impossible sans une étroite collaboration avec le clinicien, ce d'autant plus que les germes isolés (dans certains cas *Staphylococcus aureus* et souvent staphylocoques à coagulase négative, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. Et *Propionibacterium* spp.) appartiennent généralement à la flore cutanée et/ou environnementale. Par conséquent, la réalisation d'une hémoculture unique devrait être bannie de la pratique clinique puisque son interprétation en cas de positivité est très délicate. Ce problème se rencontre aussi lorsque le patient est porteur de matériel étranger, cathéter et prothèse, puisque des staphylocoques à coagulase négative, particulièrement *Staphylococcus epidermidis* , sont majoritairement isolés d'hémocultures.

Des hémocultures polymicrobiennes peuvent être rencontrées dans certaines circonstances et sur certains terrains ; c'est le cas pour les patients immunodéprimés (cirrhose, cancer colique, dysimmunité, etc.), au cours d'infections cutanées (brûlures, escarres, etc.) ou chez des patients ayant subi une chirurgie abdominale avec effraction. Dans ces situations, les germes retrouvés dans les hémocultures sont le reflet de ceux retrouvés localement au niveau du pus.

### L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

Il faut rappeler que, chez les patients au stade d'agonie, il n'est pas rare d'observer le passage de germes dans la circulation sanguine par rupture des barrières, sans que ces germes aient une signification clinique.

Toutes les souches isolées d'hémocultures doivent faire l'objet d'une identification et d'un antibiogramme. En cas de doute sur l'identité de plusieurs isolats, une étude moléculaire doit être réalisée afin de déterminer s'il s'agit bien du même clone.

Tout germe qui sera isolé d'une hémoculture devra être conservé dans une souchothèque à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Hémocultures négatives

Les hémocultures négatives signent le plus souvent une absence réelle de bactéries dans le sang. Cependant, devant un contexte clinique évocateur de sepsis, d'endocardite infectieuse ou de tout autre syndrome infectieux, il faut toujours penser à une fausse négativité. Les causes d'échec de cultures sont nombreuses : prélèvement effectué au moment non optimal, trop tardivement au cours de la maladie ; prélèvement pratiqué sous antibiothérapie ; quantité insuffisante de sangensemencé ; infection localisée sans bactériémie ; micro-organisme de culture impossible; ou enfin origine non bactérienne.

Des repiquages négatifs d'hémocultures peuvent aussi être dus à un micro-organisme de culture difficile, le choix des conditions de subcultures n'étant pas adapté et/ou le temps de culture trop court. En effet, pour certains microorganismes ayant des exigences nutritives particulières, les subcultures pourront se faire sur des milieux différents et en atmosphère adaptée en fonction de la morphologie et du contexte clinique, notamment pour les bactéries comme *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., les bactéries du groupe HACEK, ou des bactéries anaérobies. Les subcultures seront alors conservées au minimum 4 jours et traitées comme recommandé ultérieurement dans les chapitres correspondants. Il en est de même pour les streptocoques déficients, *Abiotrophia* et *Granulicatella*, qui nécessitent du pyridoxal ou de la cystéine pour leur croissance. Elles se caractérisent par une croissance en flacon d'hémoculture et une absence de croissance en milieu gélosé normal. En revanche, ces bactéries pousseront sur milieu gélosé additionné de pyridoxal ou de cystéine, ou en satellitisme autour d'une strie de *S. aureus* .[48]

### **V.1.2.1.5 Analyse bactériologique des suppurations (pus)**

Les prélèvements appelés « pus » englobent toutes les suppurations qu'elles soient superficielles (escarre, ulcère, furoncle, etc.) ou profondes (ostéomyélite, spondylodiscite, d'origine digestive, etc.). à côté de ces suppurations primitives, on distingue aussi les suppurations secondaires post-chirurgicales ou post-traumatiques.

Ces prélèvements de pus sont très fréquents et constituent une grosse part de l'activité d'un laboratoire de bactériologie.

#### **V.1.2.1.5.1 Rappel anatomo-clinique**

Les prélèvements de pus sont très divers dans leur localisation anatomique.

Ces prélèvements arrivent au laboratoire sous plusieurs aspects : écouvillonnages (furoncles, escarres, morsures), biopsies (cutanées, tissulaires), pièces opératoires, liquide prélevés de préférence à la seringue (liquide péritonéal, etc).

Les localisations purulentes sont variées et la nature des agents infectieux sont aussi très diverses.

### **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

## *Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité*

On distingue trois classes :

- Classe 1 : les prélèvements proviennent de localisations normalement stériles (cerveau, adénopathie, bile, os, etc.) et dans ce cas, si les prélèvements ont été effectués dans des bonnes conditions d'asepsie, les bactéries isolées sont directement impliquées dans le processus infectieux ;
- Classe 2 et 3 : les prélèvements peuvent être effectués soit au niveau de zones profondes communiquant avec des flores commensales qui peuvent contaminer le prélèvement (c'est le cas des prélèvements d'origine digestive), ce sont les prélèvements de classe 2 ; soit dans des zones superficielles et seront donc contaminés directement par la flore commensale, surtout s'ils sont effectués par écouvillonnage (c'est le cas des prélèvements cutanés à type d'escarre, de brûlures, de morsures, de plaies, etc.), ce sont les prélèvements de classe 3. Les bactéries recherchées seront différentes selon la localisation de la suppuration, du mode de prélèvement (seringue, biopsie, écouvillon) et du mode de transport (surtout pour la recherche d'anaérobies).

### **V.1.2.1.5.2 Prélèvements**

De manière générale, il est préférable de limiter ou minimiser les prélèvements par écouvillonnage qui seront plus facilement contaminés, plus sensibles à la dessiccation et non adaptés à la recherche de bactéries anaérobies. Leur seront préférés : les biopsies, les pièces opératoires et les prélèvements à la seringue. Les biopsies doivent être placées dans un récipient stérile. Lors des prélèvements superficiels (prélèvements de plaies, brûlures, ulcération, escarres, lésion cutanée, etc.) un nettoyage et une antisepsie de la peau, ou de la partie superficielle, seront nécessaires avant le prélèvement. Chaque fois que c'est possible, on essaiera d'aspirer à l'aiguille fine le liquide, la sérosité, le pus présent au niveau de la lésion ou d'effectuer une biopsie de la lésion. Afin d'éviter le dessèchement du prélèvement dans la seringue, il est possible ensuite d'aspirer 1 ml de sérum physiologique stérile. Il est aussi possible d'injecter de sérum physiologique en faible quantité dans la lésion et de ré-aspirer ensuite tout ce qui est possible. En cas de suspicion de cellulite, l'un des prélèvements le plus productifs est l'écouvillonnage du fond de la biopsie, réalisé aussitôt après l'acte.

Lorsque les prélèvements sont réalisés à la seringue, après remplissage avec le liquide ou le pus, il faut chasser l'air avant d'acheminer la seringue au laboratoire sans l'aiguille, après l'avoir obstruée avec un bouchon stérile.

Certains pus, notamment en chirurgie digestive ou orthopédique, peuvent être directementensemencés dans des flacons pour hémoculture au bloc opératoire.

### **V.1.2.1.5.3 Transport et stockage**

Les prélèvements de pus doivent arriver rapidement au laboratoire (< 2 heures à température ambiante), car très souvent il sera nécessaire de rechercher les bactéries anaérobies. Les prélèvements doivent arriver au laboratoire en sac hermétique, accompagnés d'une feuille de renseignement clinique. En cas de suspicion d'infection à mycobactéries ou à actinomyces, il

## **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

## ***Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité***

est nécessaire de préciser que ces bactéries doivent être recherchées afin d'effectuer un ensemencement sur milieu de culture spécifiques. Des milieux de transport peuvent être utilisés. Dans certains cas, il sera intéressant de conserver une partie de prélèvement à 80 °C pour rechercher des bactéries spécifiques par biologie moléculaire (notamment pour la recherche de bactéries intracellulaires difficiles à cultiver).

### **V.1.2.1.5.4 Traitement de l'échantillon**

Les pièces opératoires, les biopsies, les tissus seront découpés et broyés stérilement sous hotte à flux laminaire car ces prélèvements précieux ne peuvent être renouvelés. L'examen macroscopique du prélèvement peut être important (recherche de grains, etc.)

### **V.1.2.1.5.5 Examen direct**

Une coloration de Gram sera effectuée sur un frottis du produit pathologique pour les localisations profondes. On évaluera la quantité des polynucléaires, de cellules et, dans le cas des prélèvements contaminés par une flore commensale, on évaluera l'abondance de la flore.

### **V.1.2.1.5.6 Milieux de culture**

De par la diversité des bactéries potentiellement impliquées dans les prélèvements de pus, des milieux de culture enrichies seront nécessaires ainsi que des milieux sélectifs, notamment pour les prélèvements contaminés par la flore commensale.

Seront ensemencés au moins :

- Une gélose au sang incubée en anaérobiose ;
- Une gélose au sang + supplément poly vitaminique incubée sous CO<sub>2</sub> pour les bactéries de culture difficile ;
- Une gélose au sang incubée en anaérobiose sauf pour les prélèvements réalisés sur écouvillon ;
- Un milieu liquide permettant la recherche d'anaérobies.

Peuvent être ajoutés :

- Une gélose au sang + ANC incubés sous CO<sub>2</sub> ;
- Une gélose simple incubée en anaérobiose pour la culture des bactéries à Gram négatif type CLED, BCP, etc.

Des flacons d'hémocultures peuvent être ensemencés avec les prélèvements liquides, soit au lit du malade, soit au bloc opératoire, soit au laboratoire. Les milieux de cultures seront gardés au moins 48 heures en anaérobiose et 5 jours pour les localisations profondes ou pour la recherche de bactéries de culture difficile. Les milieux de culture placés en anaérobiose seront gardés au moins 5, voire 10 jours. [5]

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

### V.1.3 La phase post analytique

Le résultat d'analyse transmis doit refléter l'état clinique du patient dont provient l'échantillon. De plus, il faut veiller à ce que ce résultat soit communiqué dans un délai et selon un mode de transmission appropriés qui respectent les lois et règlements sur la confidentialité.

#### V.1.3.1 Vérification de la validité du résultat de l'analyse

Avant d'accepter le résultat, le technologiste médical doit :

- s'assurer que la maintenance préventive a été effectuée, si applicable;
- s'assurer que les résultats du contrôle de qualité sont conformes;

##### V.1.3.1.1 Interventions relatives aux signaux d'alarme et aux messages d'erreur

Chaque laboratoire doit :

- déterminer les corrections ou les mesures correctives servant à vérifier ou à valider un résultat signalé par un code d'erreur avant d'émettre le résultat final;

#### V.1.3.2 Validation biologique du résultat d'analyse

La validation biologique du résultat garantit la fiabilité du résultat de l'analyse du patient dans un contexte clinique donné. Elle permet de s'assurer de la compatibilité des résultats de l'ensemble des analyses réalisées pour le même patient à des temps différents, compte tenu des variations de son état clinique, des traitements subis et des résultats antérieurs.

Avant d'émettre un résultat, le technologiste médical doit:

- vérifier l'ordre de priorité des demandes (celles qui relèvent de l'urgence tels les résultats du LCR),
- s'assurer de la validité de tout résultat situé en dehors des intervalles de référence ou de tout résultat qui atteint les valeurs critiques;
- vérifier, lorsqu'elle est disponible, la corrélation entre le résultat actuel et le résultat précédent, les renseignements cliniques, le diagnostic et le traitement du patient;
- s'assurer, le cas échéant, de la corrélation entre le résultat et les autres examens de laboratoire;
- chercher la cause d'un résultat peu plausible (erreurs pré analytiques : hémolyse, lactescence, contamination par un soluté, présence de caillots, etc.).

#### V.1.3.3 Gestion des résultats d'alerte et des résultats critiques

Le laboratoire, en accord avec les instances médicales responsables, doit définir une liste des valeurs d'alerte et des valeurs critiques, ainsi que leur seuil, qui indiquent un état clinique mettant en danger la vie du patient.

Une procédure doit définir les mesures à prendre pour traiter et acheminer un résultat d'alerte (présence de *N.meningitis* dans un LCR, *Acinetobacter baumannii* multiresistant dans une hémoculture).

- le mode de transmission pour acheminer le résultat (par exemple, le téléphone);
- l'information à être transmise en même temps que le résultat critique (par exemple, le nom du patient, son numéro de dossier);
- la personne à aviser qui est disponible après les heures régulières d'ouverture, la fin de semaine et les jours fériés;

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## **Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité**

- la procédure explicite à suivre lorsque les efforts pour rejoindre le professionnel chargé des soins du patient ont été infructueux;
- l'enregistrement des mesures prises pour transmettre le résultat critique ou, le cas échéant, l'enregistrement de toute difficulté rencontrée lors de la transmission;
- le délai de conservation de ces enregistrements.

Le processus doit permettre de consigner le nom de la personne qui a transmis le résultat ainsi que le nom de la personne qui l'a reçu, de dater (ainsi que de noter l'heure) et de parapher les démarches effectuées jusqu'à la transmission finale du résultat au médecin ou au professionnel de la santé assurant le suivi médical du patient ou, le cas échéant, toute difficulté rencontrée pour répondre aux exigences de transmission.

Le technologiste médical est responsable de la transmission du résultat qu'il émet.

### **V.1.3.4 Validation automatique**

Dans un processus de validation automatique, les résultats qui se situent à l'intérieur des paramètres établis par le spécialiste du laboratoire sont validés de façon électronique et sont transmis électroniquement sans autre intervention.

Un suivi continu du contrôle de la qualité s'avère essentiel lorsque la validation des résultats se situant à l'intérieur des paramètres établis par le spécialiste de laboratoire est uniquement électronique. Des étapes de sécurité doivent faire partie de la procédure d'analyse, par exemple :

- la validation d'un même échantillon ne peut être effectuée automatiquement plus d'une fois au cours de la même journée afin de prévenir toute modification accidentelle au résultat déjà validé ou émis;

### **V.1.3.5 Signature des rapports**

La réglementation (30 GBEA) impose que le rapport soit signé par le pharmacien ou le médecin biologiste.

#### **V.1.3.5.1 Signature électronique des rapports**

La première source d'information que le patient utilisera, en ce qui concerne des résultats d'analyses de laboratoire, est son dossier médical.

Il est donc primordial qu'il puisse identifier quel professionnel a émis les résultats.

La traçabilité du technologiste médical dans le système d'information du laboratoire (SIL) ne doit pas être confondue avec l'obligation du technologiste médical de s'identifier sur tout rapport versé au dossier d'un patient.

La position officielle de l'Ordre (quelle référence) sur la signature électronique est la suivante :

« Ainsi, l'Ordre considère que la signature du technologiste médical doit apparaître sur tous les résultats et rapports qu'il émet, incluant ceux validés électroniquement. Cette signature peut être manuscrite, sous forme de paraphe ou de signature électronique ».

#### **V.1.3.6 Présentation du rapport d'analyse**

Le rapport d'analyse est l'aboutissement final de tout le processus d'analyse. Il doit être lisible et ne comporter aucune erreur de transcription<sup>1</sup>. Le laboratoire doit normaliser la terminologie et la présentation des rapports d'analyse.

Le rapport d'analyse doit comprendre, sans y être limité, les points suivants:

- le nom, le prénom et un numéro d'identification personnalisé du patient;

## **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

## **Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité**

- le nom ou tout autre moyen d'identification unique du prescripteur, ainsi que son adresse;
  - la date et l'heure du prélèvement de l'échantillon;
  - l'origine ou le type d'échantillon, ainsi que les commentaires sur les caractéristiques de l'échantillon susceptibles de compromettre le résultat;
  - l'identification sans équivoque de l'analyse;
  - les coordonnées du laboratoire ayant émis le rapport ainsi que les coordonnées du laboratoire sous-traitant, le cas échéant;
  - les résultats de l'analyse, y compris les unités de mesure et les intervalles de référence, s'il y a lieu;
  - l'interprétation des résultats, le cas échéant;
  - la date et l'heure de la sortie du rapport;
  - tout autre commentaire (par exemple, les résultats ou interprétations des laboratoires sous-traitants, l'utilisation d'une procédure en développement, etc.);
  - la signature ou les initiales, qui peuvent être électroniques, de la personne ou des personnes validant les résultats ou émettant le rapport.
- De plus, la date et l'heure de réception au laboratoire doivent apparaître sur le rapport.

### **V.1.3.7 Ajout d'un commentaire sur le rapport**

Toute information pouvant avoir une incidence sur le résultat doit apparaître sur le rapport d'analyse. Par exemple :

- le rapport d'un test effectué malgré le non-respect d'une condition pré analytique doit inclure un commentaire détaillé pour émettre le résultat sous réserve (par exemple : hémolyse, aspect ictérique, hyperlipémie, volume de remplissage du tube, etc.);
- tout état clinique, si disponible, inhérent au patient pouvant interférer avec le résultat doit figurer sur le rapport.

Tout commentaire ajouté doit être signé ou paraphé.

### **V.1.3.8 Émission du rapport d'analyse**

Le technologiste médical doit faire appel à sa compétence et à son jugement pour émettre des résultats de qualité.

Les procédures opératoires normalisées relatives à l'émission du rapport d'analyse doivent contenir, sans toutefois s'y limiter, les éléments suivants:

- le délai opportun entre la réception du prélèvement et la sortie du résultat en fonction de l'urgence de l'analyse;
- les étapes à suivre pour aviser le prescripteur dans le cas d'un délai d'émission du rapport susceptible d'avoir un impact sur les soins fournis au patient;
- les directives concernant un amendement aux rapports (format papier ou électronique).

Le système informatique doit être en mesure de reproduire les résultats d'analyse archivés, y compris l'intervalle de référence attribué au départ pour cette analyse, ainsi que les notes de bas de page ou commentaires d'interprétation associés à ces résultats.

Pour les résultats transmis de manière provisoire, le rapport définitif doit toujours être transmis au prescripteur.

## *Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité*

### **V.1.3.9 Transmission du rapport**

Le laboratoire doit déterminer, en concertation avec les utilisateurs de ses services, les personnes autorisées à recevoir un résultat, le format du rapport d'analyse (papier ou électronique) ainsi que la manière précise dont le rapport leur sera communiqué.

De plus, il doit s'assurer que le rapport d'analyse soit transmis au client selon un mode approprié et dans un délai respectant les directives établies.

Plusieurs lois et règlements régissent le mode de transmission des rapports d'analyse, l'accessibilité à l'information et la confidentialité des renseignements, entre autres, la Loi concernant le cadre juridique des technologies de l'information et la Loi sur la protection des renseignements personnels et les documents électroniques.

Une procédure de divulgation des résultats incluant le mode de transmission doit être établi par le laboratoire en conformité avec la Loi sur les Services de santé et les services sociaux.

Selon les procédures utilisées lors de la divulgation des résultats, le technologiste médical doit garantir la protection de la confidentialité de l'information par un moyen approprié au mode de transmission; Le technologiste médical doit respecter son Code de déontologie ainsi que les lois et les règlements régissant sa profession.

#### **V.1.3.9.1 Divulgence par téléphone et par FAX**

Le laboratoire doit avoir une politique et une procédure pour la transmission téléphonique des résultats par exemple dans les MDO telles que les méningites à méningocoque, VIH.... La transmission téléphonique doit être suivie de l'envoi du rapport d'analyse selon les conditions établies.

-Le télécopieur doit être installé dans un endroit surveillé, non accessible au public et être utilisé seulement par les personnes autorisées.

-obtenir une confirmation de réception du destinataire autorisé à recevoir la transmission.

Il est recommandé de conserver le rapport de transmission du télécopieur comme registre des envois.

#### **V.1.3.9.2 Transmission informatique des rapports d'analyse**

Certains systèmes informatiques permettent l'envoi des rapports par transmission informatique ainsi que l'accès à distance des résultats de laboratoire. Des mesures doivent être prises pour assurer la protection des renseignements confidentiels. En voici quelques exemples:

-utiliser un antivirus à jour;

-utiliser un logiciel de chiffrement;

-modifier régulièrement le mot de passe;

-le mot de passe devrait être connu seulement du personnel autorisé à accéder aux renseignements confidentiels.

#### **V.1.3.10 Correction d'erreurs sur les rapports**

Une politique et une procédure de correction d'erreurs sur les rapports doivent être établies par le laboratoire et suivies par le technologiste médical lorsqu'une erreur dans un résultat transmis est constatée.

Cette procédure doit prévoir toutes les étapes nécessaires à la correction finale au dossier du patient et doit respecter les éléments qui suivent :

### **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

## **Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité**

-Un rapport signé et versé au dossier du patient ne peut plus être retiré du dossier sous aucune considération.

-Lorsqu'un nouveau rapport est rédigé, une note mentionnant la correction datée et paraphée doit être inscrite sur le premier rapport.

-Les erreurs ne doivent, en aucune façon, être effacées ou cachées.

Lorsqu'une correction doit être apportée au rapport déjà transmis (format papier), l'erreur devrait être rayée légèrement de façon à être encore lisible et la nouvelle information ajoutée, puis datée et paraphée. Lorsqu'il s'agit d'une correction sur un rapport électronique déjà transmis, un rapport corrigé portant une mention spéciale à cet effet doit être de nouveau transmis.

### **V.1.3.11 Conservation des rapports**

Le laboratoire doit établir un calendrier de conservation pour sa documentation, et doit conserver les documents.

### **V.1.3.12 Conservation des échantillons après l'analyse**

Les échantillons doivent être conservés de façon à maintenir leur intégrité advenant l'ajout d'analyse ultérieurement ou pour consultation future. Des procédures opératoires normalisées doivent être établies spécifiant, entre autres, la durée et la température de conservation requise.

### **V.1.3.13 Élimination des échantillons**

Une fois l'analyse terminée ou le délai de conservation périmé (selon la procédure opératoire normalisée établie), les échantillons doivent être éliminés en respectant la réglementation en vigueur. Le Règlement sur les déchets biomédicaux doit être respecté.

Les objets piquants, tranchants ou cassables qui ont été en contact avec du sang, un liquide ou un tissu biologique, un contenant de sang, ou du matériel ayant été imbibé de sang font partie des déchets biologiques qui doivent être jetés dans des contenants approuvés, rigides et étanches, que l'on peut sceller et identifier comme « déchets biomédicaux ».

### **V.1.3.14 Destruction des documents renfermant des renseignements personnels**

La Loi sur l'accès aux documents des organismes publics et sur la protection des renseignements personnels et la Loi sur la protection des renseignements personnels dans le secteur *privé* obligent toute entreprise publique ou privée qui recueille, détient, utilise ou communique des renseignements personnels à mettre en place des mesures de sécurité pour protéger la confidentialité des données.

La Commission d'accès à l'information recommande que :

-Chaque employé doit se sentir responsable de la protection des renseignements personnels qu'il traite. Il doit s'assurer que le contenu confidentiel des documents, disquettes, cartouches ou rubans magnétiques qu'il jette ne puisse être reconstitué.

-Une politique sur la destruction de documents contenant des renseignements personnels doit être établie et un responsable devrait être désigné pour la mise en place et la surveillance de son application.

-Le déchiquetage est considéré comme la méthode de choix pour la destruction des documents confidentiels. [28]

## **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

### V.2 Sécurité biologique et sureté biologique

Tout échantillon arrivant au laboratoire est considéré comme infectieux

#### La sécurité biologique

Est l'ensemble des mesures techniques et pratiques mises en œuvre pour protéger l'environnement et les personnels des risques liés aux agents biologiques pathogènes (microorganismes et toxines). Elle intègre :

- des mesures physiques/techniques qui correspondent aux barrières physiques assurées par les locaux et les équipements de confinement.
- des mesures opérationnelles qui correspondent aux pratiques de précaution prises dans le travail.

#### La sureté biologique :

Est l'ensemble des mesures de protection contre le vol, le détournement et le mauvais usage de souches de microorganismes hautement pathogènes ou de toxines dangereuses.

#### V.2.1 La sécurité au laboratoire

Certains modes Opératoires Normalisés (MON) rédigés, discutés, approuvés et suivis scrupuleusement par le personnel relatifs à :

- à la manipulation appropriée du matériel biologique et des réactifs et déchets infectieux
- équipement nécessaire de protection : blouses, gants obligatoires
- la pratique de sécurité : interdit de boire, manger, fumer, ranger des aliments,
- pipetage par la bouche interdit. lavage des mains, nettoyage des paillasse (eau de javel à 10%).
- accidents surviennent par éclaboussures, piqûres, coupures, aérosols

#### Modes de contamination

-Contamination accidentelle : par le non respect des règles ; hépatites B et C post transfusionnelle, infection acquise au laboratoire ;Brucellose

-Contamination volontaire: bioterrorisme

-Voies de contamination : aérienne, digestive, cutanéomuqueuse. [29]

#### V.2.2 Microorganismes et niveau de risque

Les microorganismes sont classés en 4 groupes selon le risque infectieux qu'ils présentent:

- Groupe 1 : microorganismes non susceptibles de provoquer une maladie chez l'homme: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus*
- Groupe 2: susceptibles de provoquer une maladie chez l'homme et constituent un danger pour les personnes en contact avec ces agents; leur propagation à la collectivité est peu probable; il existe une prophylaxie et /ou un traitement efficace: *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Candida albicans*
- Groupe 3 : pouvant entraîner une maladie grave pour l'homme et constituer un danger pour les sujets en contact; propagation à la collectivité possible ;existe une prophylaxie et un traitement efficace: *Bacillus anthracis*, *Brucella sp*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis* ...
- Groupe 4: : pouvant entraîner une maladie grave pour l'homme et constituent un danger sérieux pour les sujets en contact ; risque de propagation à la collectivité est élevé; aucun traitement n'existe; aucune bactérie n'appartient à ce groupe : Filoviridae (Ebola,virus de Marburg,) Fièvres hémorragiques . [29]

#### V.2.3 Les postes de sécurité microbiologiques (PSM)

- Dans les PSM, il y a récupération puis filtration du flux d'air et de toutes les particules dégagées lors des manipulations.
- sont équipés de filtres HEPA (Haute Efficacité pour les particules aériennes). Outre leur rôle de filtration, les filtres HEPA participent au maintien de la linéarité du
- flux laminaire indispensable à une efficacité du système.

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

- Nécessité de maintenance régulière de l'enceinte : vérification semestrielle ou annuelle.
- du bon fonctionnement de l'enceinte.

### V.2.3.1 Les postes de sécurité microbiologiques ( PSM) : Hottes

**Définition** : PSM : enceinte ventilée destinée à assurer une protection du manipulateur et de l'environnement et le cas échéant du produit manipulé vis-à-vis des substances biologiquement dangereuses

- aérosols : culture de Brucella, mycobactéries



**Figure 11** : Les postes de sécurité microbiologiques ( PSM)

- Dans les PSM de type I :

il y a aspiration de l'air du local où se trouve l'enceinte et passage sur le plan de travail puis sortie, le plus souvent, dans la pièce ou à l'extérieur après filtration. La protection de l'échantillon est très faible et il faut un débit suffisant pour aspirer aussi les aérosols et microparticules produits lors de manipulations

- Les PSM de type II : plus performants avec deux filtres HEPA pour l'air de sortie et aussi pour une partie de l'air qui est recyclé à l'intérieur de l'enceinte, permet la protection de l'échantillon situé alors dans le flux laminaire dirigé du haut vers le bas.
- Les PSM de type III :

sont des enceintes entièrement fermées avec air extrait et filtré, gants intégrés, et passage de l'air de sortie sur deux filtres HEPA. Le volume de travail est en dépression. [29]

### V.2.4 Niveaux de confinement

- L'objectif : décrire le niveau de confinement minimum approprié à une manipulation sans danger d'un organisme en laboratoire
- Niveau de confinement 1 :

s'applique à la manipulation des agents du groupe de risque 1 :

n'exige aucune caractéristique de conception particulière, Il n'est pas nécessaire de prévoir des enceintes de sécurité biologique. Les manipulations peuvent se faire sur des paillasse à découvert. Les pratiques normales des laboratoires de microbiologie de base assurent le confinement nécessaire.

- Niveau de confinement 2: convient à la manipulation des agents du groupe de risque 2.

Les principaux risques d'exposition associés à des organismes devant être manipulés sont l'ingestion, l'inoculation et l'exposition des membranes muqueuses. Éviter la production d'éclaboussures et d'aérosols, sont ingérés après contamination des mains. Les principaux dispositifs de confinement sont les enceintes de sécurité biologique et les centrifugeuses à rotors scellés ou munis de godets de sécurité.

Port d'équipements de protection personnels (gants, sarraus, lunettes, etc.). Des éviers seront prévus pour se laver les mains. Des installations de décontamination (autoclaves) limiteront le risque de contamination environnementale

- Niveau de confinement 3 :

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

## Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité

Convient à la manipulation des agents du groupe de risque 3. Les agents pathogènes sont transmissibles par voie aérienne et provoqueront une maladie grave, mortelle.

Nécessité d'une protection respiratoire appropriée, des filtres HEPA pour traiter l'air évacué du laboratoire et un accès strictement contrôlé au laboratoire.

- *Niveau de confinement 4 :*

Confinement extrême autorise la manipulation d'agents transmissibles par aérosol, comportant souvent une faible dose infectieuse et entraînant des maladies graves, souvent mortelles, pour lesquelles en général aucun traitement ou vaccin n'est disponible.

Représente une unité fonctionnellement isolée indépendante des autres unités.

Le périmètre du laboratoire sera scellé afin d'isoler complètement l'agent infectieux, et la pression à l'intérieur de l'installation sera négative. Le chercheur portera une combinaison de surpression pour être également isolé de l'agent pathogène. L'air et les autres effluents produits en laboratoire seront décontaminés. [29]

### V.2.5 Les modes Opératoires Normalisés

- Toutes les procédures de laboratoire seront rédigées comme des M O N approuvées;
- Les MON originaux gardés dans bureau du chef de service.
- des copies certifiées placées dans les différentes unités du service sont revues annuellement et mis à jour.

1 . Le stockage et conservation des archives concerne:

- rapports d'activités du service et publications  
- résultats nominatifs des analyses (bulletin d'analyse) effectués par le laboratoire sont conservés pendant cinq ans.

- dossiers et registres sont conservés pendant 20 ans

- les résultats du QCE et corrections conservés pendant 5 ans. Les QCI pendant 3ans .

2 . L'espace travail : paillasses nettoyées eau de javel 10% chaque matin avant reprise des activités + fin de journée

3. La gestion des examens des patients

-étiquetage et enregistrement des échantillons

- critères de rejet : absence d'étiquette d'identification, étiquetage incorrect, volume d'échantillon incorrect, délai trop lent entre la collecte de l'échantillon et sa réception au laboratoire; hémolyse ou caillot dans le tube.

-enregistrement des résultats d'examen au laboratoire: imprimés par les machines et résultats écrits sur feuilles de paillasse: tous ces supports conservés pendant 5ans;

Tous les résultats sont transcrits quotidiennement et vérifiés par un superviseur;

4. Qualification du personnel: les dossiers individuels gardés par le chef du labo: CV, copie du diplôme...[29]

### V.2.6 Evaluation de l'assurance qualité au laboratoire

- Indicateurs de l'assurance de la qualité au laboratoire
- L'assurance qualité sera évaluée par des indicateurs qui seront analysés pour permettre des actions correctives
- Ces indicateurs sont relatifs :
  - aux tests de contrôle de qualité interne et externe (résultats attendus de 100%)
  - aux taux de rejets des échantillons : inférieur à 2% pour les prélèvements effectués au labo/ par le personnel
  - à la documentation des actions correctives
  - à l'enregistrement de la maintenance

## L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale

*Chapitre V : Mise en place de la démarche qualité*

- au délai entre lancement d'une commande et sa réception: inférieur à 4 semaines pour les réactifs et consommable
- délai d'intervention d'un service extérieur sur un appareil après demande du chef de service : inférieur à 12 Heures. [49]

# Partie pratique

## ***PARTIE PRATIQUE***

### **I. Objectifs**

Notre étude pratique a concerné le contrôle de qualité interne (CQI) de l'antibiogramme effectué au sein du laboratoire de microbiologie du CHU de Blida durant une période de six (6) mois allant du 01 Janvier au 30 Juin 2017.

Le contrôle qualité interne (CQI) de l'antibiogramme a pour objectif :

- Evaluation continue de la reproductibilité des résultats.
- Vérifier la performance des réactifs utilisés dans le test (le milieu Muller Hinton, les disques d'antibiotiques).
- Vérifier la performance du personnel qui effectue les tests et la lecture.



**Figure 12 :** Test de sensibilité aux antibiotiques (milieu Muller Hinton)

### **II. Matériels et méthode :**

#### **❖ Matériels :**

- Ce contrôle est effectué en utilisant des souches de référence ATCC (American Type Culture Collection), les souches utilisées sont :
  - *Escherichia coli* ATCC 25922
  - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
  - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
  - *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
- Ecouvillons stériles
- Tubes à vis stérile
- Milieu de culture utilisée en fonction du germe :

## ***PARTIE PRATIQUE***

- Muller Hinton pour *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

- MH au sang pour *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

-Pipette pasteur

- Disques en papier imprégnés de différentes charges d'ATB
- Appicateurs des disques
- Pied à coulisse

### ❖ **Méthode :**

#### **Le contrôle qualité interne :**

Le test est effectué dans les mêmes conditions que l'antibiogramme par diffusion des disques à partir de cultures fraîches des différentes souches ATCC de 18 heures citées ci-dessus :

-Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, ajustée par un densitomètre à une densité équivalente à 0.5 Mc Farland, l'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) sur la paroi interne du tube afin de la décharger au maximum.

-Frotter l'écouvillon chargé sur la gélose MH coulée en Boites Pétri (sur une épaisseur de 4mm) ; en stries serrées sur la gélose, tout en tournant la boîte de 60° à chaque fois et en pivotant l'écouvillon sur lui-même.

Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

-Appliquer les disques d'antibiotiques à l'aide d'un applicateur ou une pince bactériologique stérile, les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24mm, centre à centre. Le choix des antibiotiques à tester est fonction de la bactérie étudiée. (Voir la gamme des ATB ci-dessous).

-Incuber les boites, il faut respecter la température, l'atmosphère et la durée d'incubation recommandé pour chaque bactérie (Incubation à 35°C-37°C pendant 24 heures).

-Mesurer les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse puis comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.

- sont retenues comme conformes (in), tous les tests QC pour lesquels les diamètres obtenus sont comprises dans l'intervalle des diamètres critiques plus ou moins 2mm donnés par les tables de lecture

- sont considérés comme non conformes les tests QC pour lesquels les diamètres obtenus sont comprises en dehors de l'intervalle des diamètres critiques donnés par les tables de lecture.

## ***PARTIE PRATIQUE***

### ❖ **Les antibiotiques à tester sont :**

#### -Pour *E.coli* ATCC25922 :

Ampicilline ou amoxicilline, amoxicilline+acide clavulanique, céfazoline ou céfalotine, céfoxitine, cefotaxime ou ceftriaxone, imipénème, ciprofloxacine, triméthoprim+ sulfaméthoxazole, fosfomycine

#### -Pour *S.aureus* ATCC 25923 :

Pénicilline G, oxacilline, céfoxitine, kanamycine, gentamycine, amikacine, érythromycine, clindamycine, pristnamycine, vancomycine, teicoplanine, rifampicine, fosfomycine, triméthoprim+ sulfaméthoxazole, acide fusidique, tetracycline, chloramphénicol, ofloxacine.

#### -Pour *P.aeruginosa* ATCC 27853 :

Ticarcilline, Pipéracilline, Ceftazidime, aztréonam, gentamycine, tobramycine, nétilmycine, amikacine, imipénème, fosfomycine, ciprofloxacine, ticarcilline+acide clavulanique.

#### -Pour *S.pneumoniae* ATCC49619 :

Oxacilline 1µg ou 5 µg, érythromycine, clindamycine, chloramphénicol, rifampicine, triméthoprim+ sulfaméthoxazole, vancomycine, lévofloxacine, tetracycline, pristnamycine, fosfomycine(50µg)

### ❖ **Quelques recommandations du CLSI :**

**\*le milieu Muller Hinton :** doit être standardisé et permettre la croissance de nombreuses bactéries et ne doit pas contenir d'inhibiteurs d'antibiotiques.

Le milieu retenu pour la majorité des espèces bactériennes est celui de Mueller-Hinton solide simple ou enrichie de sang pour les germes exigeants, coulée sur une épaisseur de 4 mm.

#### **\*l'inoculum :**

La densité de l'inoculum bactérien est un élément primordial et elle doit être ajustée à l'aide d'un densitomètre ou par comparaison avec un étalon d'opacité (échelle de Mac Farland).

Selon la CLSI la suspension bactérienne est préparée en prélevant 4 à 5 colonies, à partir d'une culture de 24 heures sur un milieu d'isolement que l'on va mettre en suspension dans 5 ml d'eau physiologique stérile, homogénéiser, ajuster l'opacité de telle sorte qu'elle corresponde à celle d'un étalon 0.5 Mac Farland.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.

## **L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

## PARTIE PRATIQUE

L'ensemencement doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

### \*disques d'antibiotiques :

Disque de papier imprégné d'une quantité déterminée d'antibiotique, la liste ainsi que la charge des antibiotiques doivent être standardisés.

### \*la température et la durée d'incubation :

Doivent être fixes, pour la majorité des bactéries l'incubation est effectuée à 35-37°C durant 18-24 heures dans une atmosphère normale.

### III. Résultats :

Pour pouvoir valider les résultats d'antibiogramme effectués chez les malades, le laboratoire de microbiologie de CHU de Blida en tant que membre du réseau AARN (Réseau Algérien de la surveillance de la Résistance aux ATB) doit effectuer au moins 30 tests par an pour chaque souche ATCC (antibiotiques testés).

D'autre part, le pourcentage de conformité des tests CQ vis à vis d'une molécule est également considéré comme acceptable à partir de 80% des tests in.

**Tableau 2 :** Antibiotiques validés pour le CQI de l'antibiogramme d'*E.coli*ATCC25922

Critères de conformité : le nombre de tests CQI de l'antibiogramme effectués >15 test pour six mois de stage, pourcentage de conformité > 80 %.

	Antibiotiques testés											
	AMX	AMC	CZO	CTX	FOX	IPM	GEN	CIP	CS	SXT	CHL	FOS
<b>Nombre de tests effectués</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>10</b>
<b>Pourcentage (%) des tests conformes</b>	<b>93.3</b>	<b>86.7</b>	<b>6.7</b>	<b>100</b>	<b>86.7</b>	<b>40</b>	<b>33.3</b>	<b>100</b>	<b>13</b>	<b>93.3</b>	<b>93.3</b>	<b>100</b>
<b>Interprétation</b>	<b>Ok</b>	<b>Ok</b>	<b>No</b>	<b>Ok</b>	<b>Ok</b>	<b>No</b>	<b>No</b>	<b>Ok</b>	<b>No</b>	<b>Ok</b>	<b>Ok</b>	<b>Ok</b>

**PARTIE PRATIQUE****Tableau 3 :** Antibiotiques validés pour le CQI de l'antibiogramme de *S.pneumoniae* ATCC 49619

Critères de conformité : le nombre de tests CQI de l'antibiogramme effectués >15 test pour six mois de stage, pourcentage de conformité > 80 %.

	Antibiotiques testés										
	CHL	RIF	ERY	CLI	OXA1	VAN	TEC	SXT	PRI	LVX	OXA 5
Nombre de tests effectués	12	12	11	12	12	12	12	12	12	12	12
Pourcentage (%) des tests conformes	73.3	73.3	13.3	66.7	80	80	40	66.7	46.7	20	40
Interprétation	NO	NO	NO	NO	OK	OK	NO	NO	NO	NO	NO

**Tableau 4 :** Antibiotiques validés pour le CQI de l'antibiogramme de *P. aeruginosa* ATCC27853

Critères de conformité : le nombre de tests CQI de l'antibiogramme effectués >15 test pour six mois de stage, pourcentage de conformité > 80 %.

	Antibiotiques testés										
	TIC	PIP	TCC	CAZ	ATM	IPM	CIP	NET	GEN	LVX	TO B
Nombre de tests effectués	14	15	15	15	15	15	15	15	15	15	1
Pourcentage de conformité	93.3	100	100	0	100	40	100	100	33.33	53.3	0
Interprétation	OK	OK	OK	NO	OK	NO	OK	OK	NO	NO	NO

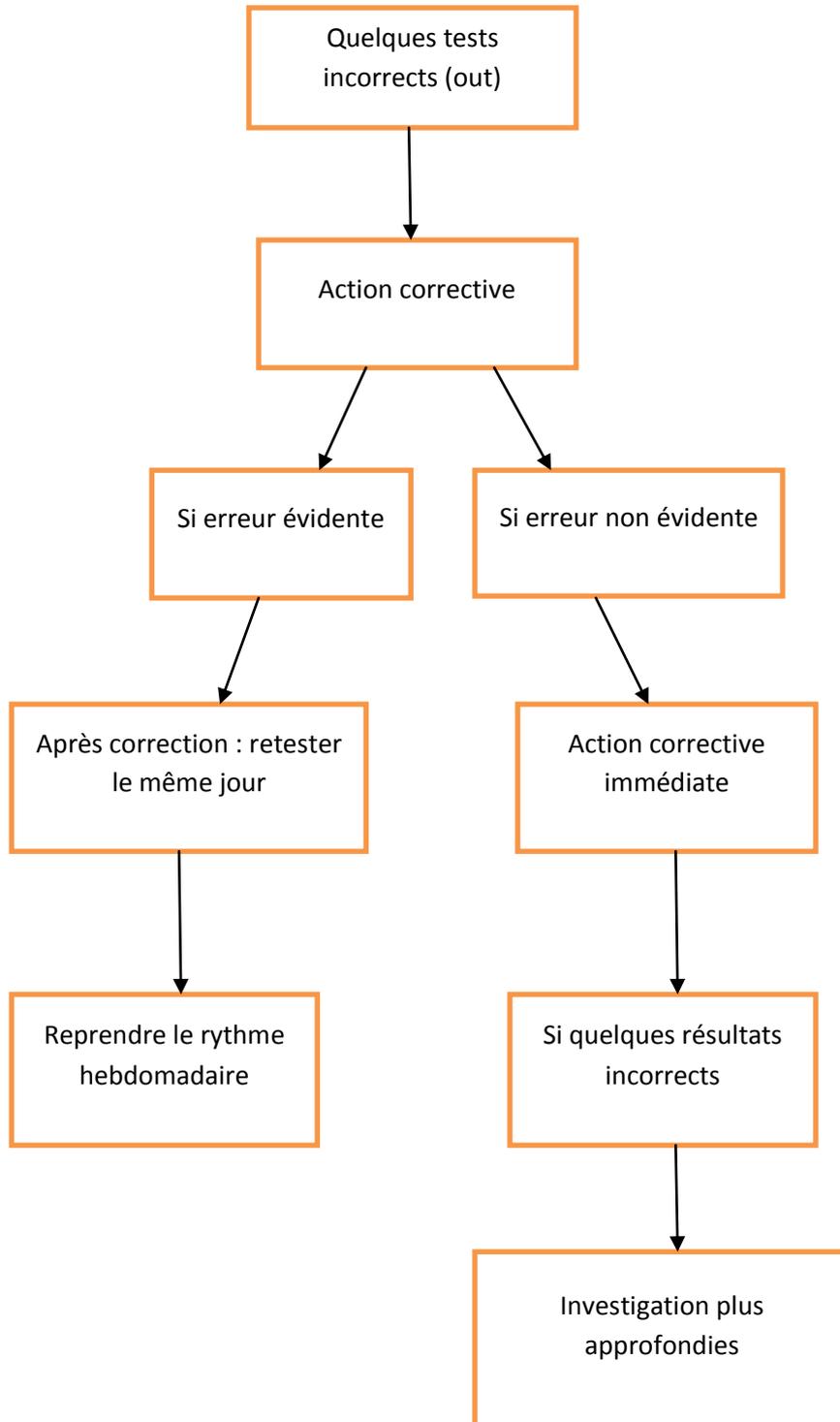
**PARTIE PRATIQUE****Tableau 5** :antibiotiques validés pour le CQI de l'antibiogramme de *S. aureus* ATCC 25923

Critères de conformité : le nombre de tests CQI de l'antibiogramme effectués >15 test pour six mois de stage, pourcentage de conformité > 80 %.

	Antibiotiques testés												
	PEN	OXA1	FOX	GEN	ERY	CLI	VAN	TEC	OFX	RIF	SXT	CHL	PR I
Nombre de tests effectués	14	15	15	6	15	13	15	15	15	15	14	15	10
Pourcentage(%) de conformité	86.6	100	93.3	40	100	86.6	100	100	100	100	100	100	13
Interprétation	Ok	Ok	Ok	No	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	No

**PARTIE PRATIQUE**

Les tests de CQ sont généralement effectués une fois par semaine ; toutefois, il arrive que certains tests s'avèrent non satisfaisants (un ou plusieurs tests incorrects c'est-à-dire out) : dans ce cas nous devons nous référer au **protocole de surveillance des tests de contrôle de qualité**.



**Figure 13 :** protocole de surveillance des tests de contrôle de qualité.

## IV.DISCUSSION

Le laboratoire de microbiologie médicale du CHU de Blida répond aux normes minima exigées dans un système d'assurance qualité :

**1. -application de techniques** de diagnostic bactériologique (prélèvements de LCR, Hémoculture, Urines, suppurations...) et résultats d'antibiogramme selon les procédures agréées par l'OMS et le CLSI et disponibles au laboratoire [35,36]

-existence de 03 (trois) contrôles de qualité de l'antibiogramme(CQI) avec l'utilisation de souches de référence ATCC ; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

- le laboratoire est soumis annuellement à un contrôle de qualité externe (CQE) par le laboratoire national de référence de l'Institut Pasteur d'Algérie (Pr K.Rahal ).

- l'enregistrement et l'exploitation des résultats des contrôles de qualité internes et de l'antibiogramme sont effectués au moyen du logiciel WHONET.

- le personnel médical (médecins, pharmacien) et para médical formés dans le domaine en qualité et quantité et équipement de base suffisant.

**2. Certaines contraintes** que nous avons identifiées ne sont pas en adéquation avec l'assurance qualité en vue d'obtenir un résultat fiable et doivent être levées, par exemple :

- au niveau de la réception du laboratoire, l'enregistrement des prélèvements de patients hospitaliers ou extra hospitaliers se fait manuellement sur un registre : il est indispensable d'informatiser toutes les données du patient et du prélèvement reçu ; cet archivage moderne permettra à la fois de mieux gérer le dossier du patient et de bien évaluer quotidiennement les activités du laboratoire.
- La phase pré- analytiques : certains prélèvements provenant des services hospitaliers (suppurations et urines) sont accompagnés de fiches de renseignements incomplètes ce qui rend l'interprétation des résultats difficile dans un prélèvement poly microbien : les cliniciens doivent être sensibilisés sur la qualité du prélèvement et les renseignements concernant les symptômes du patient.
- La phase analytique : après analyse, les résultats sont remis à la réception dans l'attente qu'un infirmier vienne les récupérer : il est important de développer la remise du résultat au moyen d'un service intranet en liaison avec les cliniciens : le médecin reçoit le résultat en temps réel surtout pour les analyses microbiologiques qui relèvent de l'urgence médicale : Examen cyto- bactériologique du LCR (cas de méningite), Hémoculture (septicémie).

***PARTIE PRATIQUE***

- Mise en place au sein du CHU de Blida d'un service de métrologie pour contrôler les balances de précision et le reste des équipements.
- En raison de coupures fréquentes du courant, nécessité de stabilisation du courant électrique pour maintenir la température adéquate (+ 4°C pour la conservation de certains réactifs conservés dans la chambre froide et réfrigérateur) et (- 20° C) pour les disques d'antibiotiques conservés dans le congélateur ,
- Approvisionnement réguliers en réactifs de base (disques d'antibiotiques, milieu Mueller Hinton).

## ANNEXES

## ANNEXE I :

**Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010  
relative à la biologie médicale (Titre II - Chapitre 1<sup>er</sup>) [44]**

« Organisation, Chapitre Ier, Accréditation et contrôle de qualité »

« Art.L. 6221-1.-**Un laboratoire de biologie médicale ne peut réaliser d'examen de biologie médicale sans accréditation.**

« L'accréditation porte sur les trois phases, définies à l'article L. 6211-2, de l'ensemble des examens de biologie médicale réalisés par le laboratoire.

« L'accréditation porte également, lorsque le laboratoire réalise ces activités ou examens :

« 1° Sur les activités biologiques d'assistance médicale à la procréation ;

« 2° Sur les examens d'anatomie et de cytologie pathologiques effectués à l'aide de techniques relevant de la biologie médicale.

« Art.L. 6221-2.-I. L'accréditation du laboratoire de biologie médicale est délivrée, à sa demande, par l'instance nationale d'accréditation prévue au I de l'article 137 de la loi n° 2008-776 du 4 août 2008 de modernisation de l'économie, lorsqu'il satisfait aux critères définis par les normes harmonisées en vigueur applicables aux laboratoires de biologie médicale, dont les références sont fixées par un arrêté des ministres chargés de la santé et de l'industrie, pris après avis de la Haute Autorité de santé.

« II. Avant l'ouverture d'un nouveau laboratoire de biologie médicale, l'instance nationale d'accréditation lui délivre, à sa demande, une attestation provisoire établissant qu'il satisfait aux critères d'accréditation susceptibles d'être vérifiés avant son ouverture. Elle prend, après l'ouverture du laboratoire et dans un délai fixé par voie réglementaire, la décision d'accréditation relative aux examens ou activités que le laboratoire réalise conformément aux critères mentionnés au I.

« III. L'instance nationale d'accréditation suspend ou retire l'accréditation du laboratoire, pour une partie ou pour la totalité de son activité, lorsqu'il ne satisfait plus aux critères mentionnés au I.

« Art.L. 6221-3.-Un laboratoire de biologie médicale établi dans un autre Etat membre de l'Union européenne ou partie à l'accord sur l'Espace économique européen peut ouvrir un site en France lorsque :

« 1° Soit le laboratoire dispose d'une accréditation délivrée par l'organisme compétent de l'Etat membre dans lequel il est établi ;

« 2° Soit l'activité liée à ce site est couverte par une accréditation délivrée dans les conditions mentionnées à l'article L. 6221-1 et répondant aux normes mentionnées à l'article L. 6221-2.

<< Art.L. 6221-5.-Dans l'accomplissement des missions d'accréditation qu'il réalise pour le compte de l'instance nationale d'accréditation, un médecin, un pharmacien ou un autre

**L'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale**

**ANNEXES**

professionnel de santé ne peut être traduit devant la juridiction disciplinaire de l'ordre dont il relève que par le ministre chargé de la santé, le procureur de la République ou le directeur général de l'agence régionale de santé.

<< Art.L. 6221-6.-L'instance nationale d'accréditation transmet sans délai à la Haute Autorité de santé, à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, à l'Agence de la biomédecine et à l'agence régionale de santé les décisions d'accréditation, de suspension ou de retrait d'accréditation des laboratoires de biologie médicale.

<< Art.L. 6221-7.-Sans préjudice des dispositions des articles L. 1221-13, L. 5212-1, L. 5222-3 et L. 5232-4, le biologiste-responsable du laboratoire de biologie médicale déclare immédiatement aux organismes mentionnés à l'article L. 6221-6 tout événement affectant son fonctionnement et susceptible d'entraîner un risque majeur pour la santé des patients.

<< Art.L. 6221-8.-Pour répondre à des situations d'urgence ou à une insuffisance grave de l'offre locale, le directeur général de l'agence régionale de santé peut autoriser le laboratoire de biologie médicale à poursuivre certaines activités pour lesquelles son accréditation a été suspendue ou retirée, pendant une durée maximale de trois mois renouvelable une fois. Sa décision est motivée. Le laboratoire de biologie médicale informe de cette décision les patients ainsi que les laboratoires de biologie médicale lorsqu'il leur transmet des échantillons biologiques en application de l'article L. 6211-19.

<< Art.L. 6221-9.-Un laboratoire de biologie médicale fait procéder au contrôle de la qualité des résultats des examens de biologie médicale qu'il réalise par des organismes d'évaluation externe de la qualité.

<< Les organismes d'évaluation externe de la qualité transmettent à l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé un rapport annuel, dont le contenu est déterminé par arrêté du ministre chargé de la santé, pris sur proposition du directeur général de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. L'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé rend publique la synthèse annuelle de ces rapports.

<< Sans préjudice des articles L. 1221-13, L. 5212-2, L. 5222-3 et L. 5232-4 et après en avoir informé le laboratoire de biologie médicale concerné, les organismes d'évaluation externe de la qualité signalent immédiatement à l'agence régionale de santé les anomalies constatées au cours de leur contrôle et susceptibles d'entraîner un risque majeur pour la santé des patients.

<< Art.L. 6221-10.-L'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé assure un contrôle national de la qualité des résultats des examens de biologie médicale, dont les modalités sont fixées par un décret qui détermine notamment les catégories d'examens de biologie médicale soumises à ce contrôle.

« Art.L. 6221-12.-Les structures qui réalisent des examens d'anatomie et de cytologie pathologiques à l'aide de techniques relevant de la biologie médicale sont soumises, au titre de ces examens, aux dispositions du présent chapitre.

## ANNEXES

## ANNEXE II :

## Sommaire de la norme NF EN ISO 15189

Sommaire	
Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Exigences relatives au management	4
4.1 Organisation et management	4
4.2 Système de management de la qualité	5
4.3 Maîtrise des documents	7
4.4 Revue de contrats	8
4.5 Analyses transmises à des laboratoires sous-traitants	8
4.6 Services externes et approvisionnement	9
4.7 Prestations de conseils	9
4.8 Traitement des réclamations	10
4.9 Identification et maîtrise des non-conformités	10
4.10 Actions correctives	10
4.11 Actions préventives	11
4.12 Amélioration continue	11
4.13 Enregistrements qualité et enregistrements techniques	11
4.14 Audits internes	12
4.15 Revue de direction	13
5 Exigences techniques	14
5.1 Personnel	14
5.2 Locaux et conditions environnementales	16
5.3 Matériel de laboratoire	17
5.4 Procédures préanalytiques	19
5.5 Procédures analytiques	22
5.6 Assurer la qualité des procédures analytiques	23
5.7 Procédures postanalytiques	24
5.8 Compte rendu des résultats	25
Annexe A (informative) Correspondance entre ISO 9001:2000 et ISO/CEI 17025:2005	28
Annexe B (informative) Recommandations relatives à la protection des systèmes informatiques de laboratoire (SIL)	32
Annexe C (informative) Éthique et laboratoires d'analyses de biologie médicale	36
Bibliographie	40

**ANNEXES****ANNEXE III :****Différents équipements du laboratoire de microbiologie**

Bain marie



Etuve bactériologique



Balance de précision



Centrifugeuse utilisée en biologie



Ph mètre



Microscope optique

*ANNEXES*

Hotte bactériologique



Densitomètre



Pipettes automatique



Diluteurs

# CONCLUSION

La mise en place d'un système d'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale est tributaire des règles de fonctionnement établies dans des référentiels « qualité » telle que la norme ISO 15189.

En Algérie , depuis le 1<sup>er</sup> Janvier 1999 a débuté la mise en place d'une assurance qualité en microbiologie médicale ; aujourd'hui 30 laboratoires de microbiologie médicale sont intégrés au réseau algérien de la surveillance de la résistance aux antibiotiques (AARN) gérés par le Ministère de la Santé Publique et le Laboratoire National de Référence de l'Institut Pasteur d'Algérie(Pr K.RAHAL) et répondent aux normes minima exigées : application de techniques de diagnostic bactériologique et résultats d'antibiogramme selon les procédures agréées par l'OMS et le CLSI et disponibles au laboratoire, mise en place d'un contrôle de qualité de l'antibiogramme( CQI), mise à jour annuelle du fascicule de standardisation à l'échelle nationale de l'antibiogramme , évaluation annuelle de toutes les activités des 30 laboratoires, existence d'un contrôle de qualité externe (CQE) annuel , installation d'un comité d'experts pour la rédaction des procédures et des techniques bactériologiques, personnels médical(médecins, pharmacien ) et para médical formés dans le domaine en qualité et quantité et équipement de base suffisant.

Néanmoins, de nombreuses contraintes doivent être levées pour la mise en place d'un système d'assurance qualité dans les laboratoires de microbiologie médicale : les structures doivent faire l'objet d'une mise à niveau, installation d'un service de maintenance des équipements pourvu de moyens adéquats, stabilisation du courant électrique, approvisionnement régulier en réactifs de base ( disques d'antibiotiques, milieu Mueller Hinton) et informatisation de toutes les activités biologiques.

La mise en place d'une politique nationale de laboratoire est primordiale pour pouvoir développer un système d'assurance qualité dans tous les laboratoire d'analyses biologiques ; cette politique sera basée sur les points suivants : création d'une direction nationale des laboratoires au sein du MSP RH qui accompagnera sur le plan budgétaire tout laboratoire d'analyses impliqué dans une démarche d'assurance qualité.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

### Bibliographie :

[1] Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale. Arrêté du 2 novembre 1994 et Arrêté du 26 novembre 1999. Journal officiel de la République française ([www.legifrance.gouv](http://www.legifrance.gouv)).

[2] Abba TOUITA KABBAJ ; développement de la structure d'assurance qualité du laboratoire de physiologie et d'évaluation neuromusculaire dans la perspective de l'accréditation COFRAC suivant le référentiel NF en ISO /CEI 17025 :2005 rapport de stage ; Université de Technologie de Compiègne, master management de la qualité 2006 /2007.

[3] American Academy of Pediatrics. Practice parameter: the diagnosis, treatment, and evaluation of the initial urinary tract infection in febrile infants and young children. American Academy of Pediatrics. Committee on Quality Improvement. Subcommittee on Urinary Tract Infection. Pediatrics 1999; 103: 843 – 52.

[4] BOUZAE, SANJUANR, MUNOZP, et al.  
An European perspective on nosocomial urinary tract infections I. Report on the microbiology workload, etiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI- 003 study). European Study Group on Nosocomial Infections. Clin Microbial Infect 2001; 7: 523 – 31

[5] Courvalin P, Leclercq R, Bingen E.  
Antibio-gramme. 2. édition. ESKA, Paris, 2006.

[6] Infections urinaires nosocomiales de l'adulte.  
Conférence de consensus Co-organisée par la Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF) et l'Association française d'urologie (AFU)  
Med Mal Inf. 2002 ; 33 : 193 – 215 .

[7] Comité de l'antibiogramme de la Société française. Communiqué 2005. Société française de Microbiologie. [www.sfm.asso.fr](http://www.sfm.asso.fr)

[8] Dumontet M, Vassaut A, Fuss-Ohlen et al.  
groupe assurance qualité et métrologie de la SFBC, Recommandation pour l'installation dans le laboratoire de la fonction métrologie  
-Document B. Annales de Biologie clinique. 2004 ; 62 : 479-486.

[9] Dumontet M. Problématique de la maîtrise métrologique des instruments d'analyses automatiques. Spectra Biologie. 2005 ; 147 : 37-39.

[10] Documents de COFRAC :

-Modalités de candidature à l'accréditation par la section du COFRAC, document LAB INF 20-révision 00-Février 2006, section laboratoire, Edition COFRAC.

-Exigences pour l'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO /CEN 17025, document LAB REF 02-révision 03-Novembre 2006, section laboratoire, Edition COFRAC.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE**

-Règlement d'accréditation,document LAB REF 05-révision 02-Novembre 2005,section laboratoire,édition COFRAC.

-Expression et évaluation des portées d'accréditation,document LAB REF 08-révision 01-Novembre 2006,section Laboratoires,édition COFRAC.

-Questionnaire de renseignements généraux,document LAB FORM 05-révision 01 Novembre 2005,section laboratoires,édition COFRAC.

-Questionnaire d'auto-évaluation préparation des visites d'évaluation,document LAB FORM

-Questionnaire de renseignements techniques,document LAB FORM 06-révision00-Novembre 2005,section laboratoires,édition COFRAC

-Pour une productibilité accrue,une meilleure organisation et une standardisation de l'ensemencement,bioMérieux.

[11] EVALMIC ;questionnaire d'auto-évaluation d'assurance qualité en microbiologie.Paris 1998

[12] European Confederation of Laboratory Medicine. European urinalysis guidelines. Scand J Clin Lab. Invest 2000 ; 231 : 1 – 86 .

[13] Ghnassia JC,Antoniotti GDavin-Régli A.L'assurance qualité au laboratoire de bactériologie.ESKA,Juin 2006,Section 1,chapitre 12 :le diagnostique bactériologique.

[14] Hoen B,Alla F,Selton-Suty C et al ;Association pour l'étude et la prévention de l'endocardite infectueuse(AEPEI).

[15] KASS EH . Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract ; with observations on the use of methionine as a urinary antiseptic . AMA Arch Intern Med 1957 ; 100 : 709 – 14 .

[16] L'accréditation obligatoire des LBM ;Optio Bio l'actualité du praticien biologiste ;Supplément au n°444 Novembre 2010.

[17] Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire ; Troisième édition. Direction générale de la santé. Canada

[18] Le processus d'accréditationdans le secteur de la santé ;Pharmalink-Oct-Nov-Dec-2012

[19]Miller MJ,Holmes HT,Krisher K.General principles of specimen collection and handling.In :Mur-Ray pr Baron EJ,Jorgensen JH,Pfaller MA,Yolken RH Manual of clinical Microbiology.ASMpress,8Th Ed,Washington 2003,p.55-66.

[20] Mainardi JL,Vandenesch F,Casalta JP et al.Recomandation pour le diagnostic microbiologique.Bulletin de la société française de Microbiologie.1995 ;10 :12-15.

[21] MEARES EM , STAMEY TA . Bacteriologic localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis . Invest Urol 1968 ; 5 : 492 – 518 .

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE**

- [22] Malvaux S, Brochard H, Cazaubiel M et al. Les 222 exigences du GBEA. *Spectra Biologie*. 2000 ; 19 : 24-30.
- [23] Manuel d'accréditation des établissements de santé. Paris, ANES, 1999 (2003 sur le site de l'ANAES).
- [24] Norme NF en ISO 15189, Octobre 2003, s'obtient sur le site de l'AFNOR.
- [25] Nagy Hadjad : Le processus d'accréditation dans le secteur de la santé ; *Pharmalink* 4<sup>e</sup> Trimestre 2012. Algérie.
- [26] NICOLLE LE, BRADLEY S, COLGAN R, et al. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults . *Clin Infect Dis* 2005 ; 40 : 643 – 54.
- [27] Pascal P, Beyerle F. Les référentiels qualité applicables dans les laboratoires de biologie médicales.
- [28] PR Rachid BELOUNI, cours résidanat en Biologie clinique troisième année, Février 2016 ; l'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale.
- [29] REMIC 2002. Référentiel en microbiologie médicale. 2<sup>ème</sup> ed, Montmorency.
- [30] Référentiels HAS : Guide d'évaluation juin 2005 sur le site de la HAS.
- [31] Révision de la conférence de consensus de mars 1992. *Med, Mal, infect*. 2002 ; 32 : 587-595.
- [32] Rémic (Référentiel en microbiologie médicale). 4<sup>e</sup> édition 2010.
- [33] Réseau algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques (AARN): [www.sante.dz/aarnm](http://www.sante.dz/aarnm)
- [34] STAMM WE, COUNTS GW, RUNNING KR, et al. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. *N Engl J Med* 1982; 307: 463 – 8.
- [35] Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale. Algérie. OMS. Edition 2015.
- [36] Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Algérie. OMS. 16<sup>ème</sup> Rapport d'évaluation. Edition 2015
- [37] WILSON ML, GAIDO L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1150 – 8.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE****Sito-graphie :**

[38]AFNOR :<http://www.afnor.fr>

[39]AFSSAPS :<http://www.afssaps.sante.fr>

[40]ATCC-LGC Promochem(collection ATCC) :<http://www.lgcpromochem.com/atcc>.

[41]Campus de microbiologie médicale :bactériologie-virologie-hygiène hospitalière :<http://www.microbe-edu.org>.

[42]CDC(Center for diseases control) :<http://www.crbip.pasteur.fr>.

[43]CIP(collection de l'institut pasteur)/<http://www.crbip.pasteur.fr>.

[44]COFRAC/<http://www.cofrac.fr>.

[45]Contrôle national de qualité :voir sur le site de l'AFSSAPS rubrique Sécurité sanitaire et vigilances-item/Contrôle National de qualité

[46] ELI: <https://www.legifrance.gouv.fr>

[47]GBEA :<http://sante.gouv.fr>.

[48]HAS(référentiels de Haute autorité de santé) :<http://www.has.fr>.

[49]OMS(Organisation mondiale de santé) :<http://www.who.int>.

[50]onerba(Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotique) :<http://www.onerba.org>.

[51]QCMD :[www.qcmd.org](http://www.qcmd.org).

[52]SFM(Société française de microbiologie),site sur lequel se trouvent le guide d'évaluation Evalmic et les recommandations du Comité de l'antibiogramme :<http://www.sfm.asso.fr>.

**Tableau 6 :** Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence utilisées pour le contrôle de qualité.

Antibiotiques testés	Charge des disques	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226
Amikacine	30µg	19-28	20-26	18-26	.....	.....	.....
Amoxicilline + Ac clavulanique	20/10µg	18-24	28-36	.....	.....	15-23	.....
Ampicilline	10µg	18-22	27-35	.....	30-36	13-21	.....
Azithromycine	15µg	.....	21-26	.....	19-25	13-21	.....
Ac nalidixique	30µg	22-28	.....	.....	.....	Non déterminé	.....
Aztréonam	30µg	28-36	.....	23-29	.....	30-38	.....
Cefazolin	30µg	21-27	29-35	.....	.....	.....	.....
Céfaloine	30µg	15-21	29-37	.....	26-32	Non déterminé	.....
Céfotixime	30µg	23-28	23-29	.....	33-41	.....	.....
Céfotaxime	30µg	29-35	25-31	18-22	31-39	31-39	38-48
Céftazoxime	30µg	28-35	22-28	17-23	.....	.....	39-51
Cefazidime	30µg	.....	.....	22-29	.....	27-35	35-43
Ciprofloxacine	5µg	30-40	22-30	25-33	.....	34-42	48-58
Colistine	10µg	11-17	.....	11-17	.....	.....	.....
Chloramphénicol	30µg	21-27	19-26	.....	23-27	31-40	.....
Clindamycine	2µg	.....	24-30	.....	19-25	.....	.....
Doxycycline	30µg	18-24	23-29	Non déterminé	25-34	.....	.....
Ertapénème	10µg	29-28	24-31	13-21	28-35	20-28	.....
Erythromycine	15µg	.....	22-30	.....	25-30	.....	.....
Fosfomycine	200µg	22-30	25-33	Non déterminé	.....	.....	.....
Furanes	300µg	20-25	18-22	.....	23-29	.....	.....

Tableau 7 : (Suite)

Antibiotiques testés	Charge des disques	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC49226
Gentamicine	10µg	19-26	19-27	17-23	...	...	...
Gémifloxacin	5µg	28-36	27-33	19-25	...	...	...
Imipenem	10µg	28-32	...	20-28	...	21-29	...
Kanamycine	30µg	...	19-26	...	...	...	...
Levofloxacine	5µg	29-37	25-30	19-26	20-25	32-40	...
Nétilmicine	30µg	22-30	22-31	17-23	...	...	...
Oloxacine	5µg	29-33	24-28	17-21	16-21	31-40	43-51
Oxacilline	1µg	...	18-24	...	≤ 12	...	...
Penicilline	10UI	...	26-37	...	24-30	...	26-34
Pipéracilline	100µg	24-30	25-33	25-33	...	33-38	...
Rifampicine	5µg	8-10	26-34	Non déterminé	25-30	22-30	...
Spectinomycine	100µg	...	...	...	...	...	23-29
Tétracycline	30µg	18-25	24-30	...	27-31	14-22	30-42
Ticarcilline	75µg	24-30	...	21-27	...	...	...
Ticarcilline + Ac clavulanique	75/10µg	24-30	28-37	20-28	...	...	...
Tobramycine	10µg	18-26	19-29	20-26	...	...	...
Triméthoprimine + sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	23-29	24-32	...	20-28	24-32	...
Telcoplanine	30µg	...	15-21	...	...	...	...
Tigécycline	15µg	20-27	20-25	9-13	23-26	23-31	30-40
Vancomycine	30µg	...	17-21	...	20-27	...	...

## RESUME

L'acte de biologie médicale s'inscrit dans une démarche préventive, diagnostique, pronostique. En microbiologie médicale l'assurance qualité est l'ensemble des activités préétablies systématiques mise en œuvre dans le cadre de système de qualité. Chaque laboratoire doit être certifié, accrédité par un organisme tiers selon la norme référence ISO/CEN 15189, les organismes d'accréditation sont l'ALGERAC (Algérie), COFRAC(France). Le laboratoire de microbiologie du CHU de Blida répond aux normes minima exigées dans un système d'assurance qualité par:

- l'application de techniques de diagnostic bactériologique (prélèvements de LCR, Hémoculture, Urines, suppurations...) et résultats d'antibiogramme selon les procédures agréées par l'OMS et le CLSI ,

- l'existence de 03 (trois) contrôles de qualité de l'antibiogramme(CQI) avec l'utilisation de souches de référence ATCC ; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

- la soumission au contrôle de qualité externe (CQE) géré par le laboratoire national de référence de l'Institut Pasteur d'Algérie (Pr K.Rahal ).

- l'enregistrement et l'exploitation des résultats des contrôles de qualité internes et de l'antibiogramme sont effectués au moyen du logiciel WHONET.

- la présence d'un personnel médical (médecins, pharmacien) et para médical formés dans le domaine en qualité et quantité avec un équipement de base suffisant.

Les tests de contrôle de qualité interne(CQI) effectués durant notre stage pratique (du 1<sup>er</sup> Janvier au 30 Juin 2017) sont conformes aux exigences de l'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale.

Néanmoins, les contraintes que nous avons identifiées (cf chapitre IV Discussion) doivent être levées.

**Mots clés :** Assurance qualité, microbiologie médicale, accréditation, certification, Algerac, métrologie, contrôle de qualité interne de l'antibiogramme(CQI),contrôle de qualité externe (CQE)

## SUMMARY

The act of medical biology is part of a preventive, diagnostic, prognostic approach. In medical microbiology quality assurance is the set of systematic pre-established activities implemented within the framework of quality system. Each laboratory must be certified, accredited by a third party body according to ISO / CEN standard 15189, the accreditation bodies are ALGERAC (Algeria), COFRAC (France). The microbiology laboratory of Blida University Hospital meets the minimum standards required in a quality assurance system by:

- the application of bacteriological diagnostic techniques (CSF specimens, blood cultures, urine, suppurations ...) and results of antimicrobial tests according to procedures approved by WHO and CLSI, - the existence of 03 (three) quality controls Of the antibiogram (CQI) with the use of ATCC reference strains; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. - External Quality Control (EQA) submission by the National Reference Laboratory of the Pasteur Institute of Algeria (Pr K.Rahal ). - the recording and evaluation of the results of the internal quality controls and the susceptibility test are carried out using the WHONET software. - the presence of medical personnel (doctors, pharmacists) and paramedics trained in the field in quality and quantity with adequate basic equipment.

The internal quality control (CQI) tests carried out during our practical internship (from 1 January to 30 June 2017) comply with quality assurance requirements in a medical microbiology laboratory.

Nevertheless, the constraints we have identified (see Chapter IV Discussion) must be removed.

**Keywords :** Quality assurance, , Medical microbiology, accreditation, certification, Algerac metrology, Quality control of the antibiogram(CQI),External Quality Control (EQA).

## GLOSSAIRE

**Asepsie** : Consiste à empêcher la contamination d'une zone ou d'une surface par des micro-organismes étrangers (bactéries, parasites...).

**Bactériémie** : Désigne la présence de bactéries pathogènes dans le sang. La bactériémie n'est pas forcément responsable de signes cliniques, surtout lorsque ce passage est transitoire.

**Biothèques** : Banque de données d'échantillons biologiques

**Cellule de Malassez** : hématimètre qui permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution.

**Compte d'Addis** : Méthode utilisée surtout pour la mise en évidence d'une hématurie microscopique (présence de sang dans l'urine mais en quantité insuffisante pour lui donner une coloration rouge, visible à l'oeil nu).

**Document normatif** : Document qui donne des règles, des lignes directrices ou des caractéristiques pour les activités ou leurs résultats<sup>1</sup>. Il comprend des documents tels que les normes, les spécifications techniques, les codes de pratique et les règlements.

**Endocardite** : inflammation de l'endocarde (structures et enveloppe interne du cœur, incluant les valves cardiaques). C'est une maladie assez rare mais souvent grave.

**Flore** : Est l'ensemble des bactéries présentes sur la peau et les muqueuses des sujets, est formée dès les premières heures de la vie à partir de l'environnement. Elle varie en fonction de l'âge, de l'alimentation, du climat et des thérapeutiques suivies.

**Flore polymorphe** : Se dit lorsque les cultures bactériologiques mettent en évidence plusieurs bactéries différentes. Est habituellement rassurant.

**Fontanelle** : La fontanelle est un espace situé entre les os du crâne chez les nouveaux nés, et possédant encore une structure membraneuse.

**Iatrogène** : Se dit des troubles provoqués par un traitement médical ou un médicament.

**Méningite** : Le terme méningite caractérise toutes les inflammations aiguës ou chroniques, des méninges cérébrales et médullaires (de la moelle épinière), ainsi que du liquide céphalo-rachidien, ceci indépendamment de la cause.

**Milieu chromogène** : Le principe de ce milieu, sélectif ou non, repose sur la présence d'un ou plusieurs substrats chromogènes permettant la coloration des colonies à la suite de sa dégradation par des enzymes bactériennes spécifiques et de la libération du chromophore. Si l'enzyme n'existe que chez une espèce bactérienne donnée, l'identification est immédiate.

**Norme/standard** : Document, établi par consensus et approuvé par un organisme reconnu, qui fournit, pour des usages communs et répétés, des règles, des lignes directrices ou des

caractéristiques, pour des activités ou leurs résultats, garantissant un niveau d'ordre optimal dans un contexte donné.

**Nosocomiale** : Est employé pour une maladie contractée lors d'une hospitalisation dont le synonyme est infection hospitalière. Une maladie nosocomiale est aussi appelée infection associée aux soins

**Pathogénicité** : se dit d'une bactérie qui est nuisible à son hôte, on en distingue les bactéries pathogènes spécifiques et opportunistes.

**Produits sanguins labiles** : PSL, est un produit à usage thérapeutique issu d'un don de sang. Il peut s'agir d'un don de sang total, ou d'un don de sang par apharesèse

**Protéine de Tamm-Horsfall** : Est la protéine la plus abondante de l'urine normale (jusqu'à 100 mg/24 h) et le composant majoritaire des cylindres tubulaires. D'origine rénale. Sa forte propension à former des gels a laissé supposer qu'elle pourrait jouer un rôle dans l'imperméabilité à l'eau de la branche ascendante de Henlé .

**Purpura** : Est une lésion hémorragique de la peau ou des muqueuses, de couleur rouge à pourpre, ne s'effaçant pas à la vitropression, due à une extravasation de sang dans le derme.

**Règlement** : Toute disposition prise par une agence gouvernementale ou une autorité administrative. Les normes peuvent être développées à un niveau international, national ou local. La conformité à une norme peut être requise par le gouvernement ou une autre autorité ou encore être volontaire.

**Septicémie** : infection grave de l'organisme, se caractérisant par la présence dans le sang de germes pathogènes.

**Sérotype** : Il s'agit de l'ensemble des caractéristiques antigéniques qui permettent de faire la différence entre les souches qui appartiennent à une même espèce.

**Sepsis** : Est un terme qui remplace la septicémie. Est défini comme l'ensemble des symptômes générés par l'organisme en réponse à une inflammation systémique.

**Système de drainage** : C'est un système, qui placé dans des cavités naturelles ou opératoires, est destiné à favoriser l'écoulement vers l'extérieur de liquide physiologique ou de rétention.

**Technique de milieu de jet** : Après « toilette intime » et désinfection soignée des muqueuses à l'aide d'un antiseptique (dakine), on demande au patient d'uriner dans un pot stérile. Dans la mesure du possible, on ne recueille que le second jet, le premier pouvant être contaminé par les germes situés à la partie terminale de l'urètre.

**WHONET** : Logiciel de saisie et d'exploitation des résultats d'antibiogramme fourni par l'OMS

HALLAH Loubna

Adresse mail.  
mohaloubna1989@outloutk.fr

RIOUGUI Khadidja

Adresse mail.  
riouguikhadidja06@gmail.com

## RESUME

L'acte de biologie médicale s'inscrit dans une démarche préventive, diagnostique, pronostique. En microbiologie médicale l'assurance qualité est l'ensemble des activités préétablies systématiques mise en œuvre dans le cadre de système de qualité. Chaque laboratoire doit être certifié, accrédité par un organisme tiers selon la norme référence ISO/CEN 15189, les organismes d'accréditation sont l'ALGERAC (Algérie), COFRAC(France). Le laboratoire de microbiologie du CHU de Blida répond aux normes minima exigées dans un système d'assurance qualité par:

- l' application de techniques de diagnostic bactériologique (prélèvements de LCR, Hémoculture, Urines, suppurations...) et résultats d'antibiogramme selon les procédures agréées par l'OMS et le CLSI ,
- l'existence de 03 (trois) contrôles de qualité de l'antibiogramme(CQI) avec l'utilisation de souches de référence ATCC ; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.
- la soumission au contrôle de qualité externe (CQE) géré par le laboratoire national de référence de l'Institut Pasteur d'Algérie (Pr K.Rahal ).
- l'enregistrement et l'exploitation des résultats des contrôles de qualité internes et de l'antibiogramme sont effectués au moyen du logiciel WHONET.
- la présence d'un personnel médical (médecins, pharmacien) et para médical formés dans le domaine en qualité et quantité avec un équipement de base suffisant.

Les tests de contrôle de qualité interne(CQI) effectués durant notre stage pratique (du 1<sup>er</sup> Janvier au 30 Juin 2017) sont conformes aux exigences de l'assurance qualité dans un laboratoire de microbiologie médicale.

Néanmoins, les contraintes que nous avons identifiées (cf chapitre IV Discussion) doivent être levées.

**Les mots clés :** Assurance qualité, microbiologie médicale, accréditation, certification, Algerac, métrologie, contrôle de qualité interne de l'antibiogramme(CQI),contrôle de qualité externe (CQE)

**Keywords :** Quality assurance, , Medical microbiology, accreditation, certification, Algerac metrology, Quality control of the antibiogram(CQI),External Quality Control (EQA).