



Spécificités de l'accréditation en bactériologie

Exemple : la coproculture du pré analytique au post- analytique

C. Eloy, M. Thouvenin
C.H. Troyes

Le pré analytique

Coproculture

Indications

Recherche de bactéries ou virus responsables d'un syndrome diarrhéique aigu qui donne plus de 3 selles/jour.
Diagnostic d'infection à *Clostridium difficile*
Recherche de portage de ***Salmonella*** et ***Shigella***
Dénombrement de la flore pour les patients neutropéniques
Recherche de bactéries multirésistantes en épidémiologie

Techniques du prélèvement

Les selles sont mises dans un pot stérile, un simple écouvillonnage est acceptable pour la recherche de BMR

Renseignements cliniques

Ils sont indispensables pour orienter les recherches

- **Fièvre associée (germes invasifs *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*)**
 - **Post syndrome appendiculaire (*Yersiniose*)**
 - **Toxi-infection alimentaire (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Clostridium perfringens*) et si cas groupés**
 - **Patient sous antibiotiques (*Clostridium difficile*)**
 - **Occlusion avec fièvre ou douleurs abdominales avec hyperleucocytose chez le sujet âgé (*Clostridium difficile*)**
 - **Syndrome hémolytique urémique (EHEC)**
 - **Patient neutropénique (*Aeromonas*, *Pseudomonas*)**
 - **Voyage récent en pays tropical (*E. coli*, *Choléra*, *Plesiomonas*)**

Transport

Rapide si selles sanglantes, à température ambiante si moins de 2 heures sinon à + 4°C et pas plus de 12 heures pour recherche de toxine **Clostridium difficile**

Délai pour prescription complémentaire

Les selles sont conservées 48 heures à 4°C et les souches un an

Interprétation des résultats

L'urgence dans le diagnostic de diarrhée infectieuse est le syndrome hémolytique et urémique et ne se traite pas par antibiotique. Seules les diarrhées à **Shigella**, **Yersinia**, **Campylobacter** nécessiteront un traitement

*Pour les **Salmonella** selon les signes cliniques aux âges extrêmes de la vie, car la crainte est un portage chronique induit par l'antibiothérapie.*

Le pré analytique

- **Toujours avoir le contexte soit par le médecin soit par le malade lui même.**
- **Sinon le risque est de faire trop ou pas assez.**
- **sans aucun contexte, ce sont les examens macroscopique et microscopique qui aideront.**

Validation de méthode de l'examen de la coproculture

COPROCULTURE REMIC 2010

Indications	Recherches	Cultures	Sérotypage	Test
Standard Nomenclature	<i>Salmonella Shigella</i> <i>Campylobacter Arcobacter</i> <i>Yersinia <20 ans</i>	Oui Oui Oui	Oui	Oxydase Urée
Post-antibiotique	<i>Clostridium difficile</i>	Oui		GDH Toxines A et B
Sanguinolante	<i>Shigella</i> <i>EHEC</i>	Oui Oui	Oui	STEC
Voyage	<i>Vibrio</i> <i>ETEC EIEC</i> <i>Plesiomonas</i> <i>Aeromonas</i>	Oui Oui Oui Oui	Oui Oui	Oxydase Oxydase indole
T.I.A.C.	<i>Vibrio</i> <i>Aeromonas</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacillus cereus</i>	Oui Oui Oui Oui		
Dépistage BMR	<i>EBLSE</i> <i>ERG</i>	Oui Oui		

Vérifications sur site SH GTA 04 méthode qualitative

Spécificité	non
Sensibilité diagnostique	si besoin
Contamination entre échantillons	oui
Stabilité	si besoin
Robustesse	non
Corrélation avec méthode de référence	non
Corrélation avec méthode déjà utilisée	oui si possible

FICHE TYPE QUALITATIF (Portée A/B^[1])

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :

Note : le laboratoire se réfèrera au tableau en page XX du SH GTA 04 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou validation (portée B)

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	Coproculture (recherche d'agents pathogènes responsables de diarrhée)
Principe de la Mesure :	-Cultures avec identification bactérienne et étude de sensibilité aux antibiotiques - recherche de toxines et ou antigène par immuno-essai
Méthode de mesure :	NC
Marquage CE (Oui/Non)	oui
Codage national (AFSSAPS) :	?

^[1] Dans le cadre d'une portée B, le laboratoire aura à sa charge d'établir un protocole d'évaluation propre aux items et aux examens concernés par la portée B.

MISE EN OEUVRE

Opérateurs (habilitation) :	7 techniciens habilités MIC LG CC01
Procédure de validation :	MIC PG RE01
Procédure de gestion de la portée flexible :	MIC PG RE01
Période d'évaluation :	du : 01/08/2010 au 30/09/2010
Date de mise en service :	Octobre 2010
Autorisation par :	C. Eloy

MAITRISE DES RISQUES

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, additifs, type de récipient (tubes, ...)) :	Selles en pot stérile, écouvillonnage rectal	MIC FI RB01 Guide des prélèvements fiche coproculture
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Suspension en sérum physiologique stérile	MIC MO REB08 Coproculture
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : préciser les références des procédures et enregistrements.	Personnel habilité à chaque poste de travail	- MIC PS CC01 Habilitation du personnel en microbiologie - MIC EQ CC02 Réception des prélèvements de microbiologie - MIC EQ EQCC04 habilitation pour analyses de bactériologie

<p>Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Locaux sous surveillance de température : sonde reliée au Labgard - Climatisation sans mouvement d'air 	<p>Sonde vérifiée par le responsable métrologie</p>
<p>Référence du réactif (référence fournisseur, version) :</p>	<p>La liste des réactifs est trop longue pour ce tableau (1)</p>	<p>Marqués CE Dates de réception et de péremption saisies dans le logiciel Winlabo et sur le coffret la date de réception Traçabilité du lot par patient</p>
<p>Matériau de références (témoins) :</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Souches bactériennes de référence <i>Salmonella typhi murium</i>, <i>Shigella sonnei</i>, <i>Yersinia enterocolitica</i> - Souches de collection pour contrôles de l'identification et antibiogramme - contrôles internes des trousses 	<p>Souches identifiées par CNR pour contrôle des milieux et immuns sérums</p> <p>Souches CIP</p> <p>Marquage CE Traçabilité du lot et des contrôles</p>

Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	<ul style="list-style-type: none"> - Vitek 2 maintenance semestrielle - Etuves à 35°C et 30°C +/-1.5°C - balance - minuteur - Hotte PSM II maintenance annuelle	Sondes, balance et minuteur vérifiés par le responsable métrologie et étuves cartographiées annuellement
--	---	---

*** item à renseigner si nécessaire**

Désignation du produit	Fournisseur	Référence fournisseur
Milieus gélosés, bouillons, trousses, tests unitaires, immun sérums, galeries et ATB	6 fournisseurs	55 références

SPECIFICITE / SENSIBILITE

Résultats de l'étude à partir d'une étude clinique

Bibliographie, Fiche produit fournisseurs et EEQ

- **Données fabricant par rapport au test de cytotoxicité trousse Toxines A et B Clostridium difficile**
 - **Sensibilité 93.1%**
 - **Spécificité 98.9 %**
 - **VPP 97.1 %**
 - **VPN 97.2 %**
 - **Sensibilité analytique 3 ng**
 - **Spécificité analytique croisement uniquement avec *Clostridium sordelli***
 - ***Faux positifs colonisation chez 50 % des enfants et 32 % des mucoviscidosiques***

CONTAMINATION

**Inter-échantillon pour
les paramètres
sensibles**

non

**Inter-réactif si
nécessaire**

NC

**Vérification
bibliographique**

NC

COMPARAISONS DE METHODES

Méthode précédente,
autre méthode utilisée
dans le laboratoire

NC

ROBUSTESSE

Données bibliographiques

Liée aux réactifs. Respect de la péremption

Résultats

Rien à faire

**Conclusions et
dispositions :**

Sans objet

STABILITE

**Données
bibliographiques**

**Liée aux réactifs. Respect de la
péremption et température de stockage
contrôlée**

Résultats

Rien à faire

**Conclusions et
dispositions :**

Sans objet

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

SPECIFICITE/SENSIBILITE

Résultats de l'étude à partir d'une étude clinique

Bibliographie, Fiche produit fournisseurs et EEQ

CONTAMINATION

Inter-échantillon pour les paramètres sensibles

non

Inter-réactif si nécessaire

NC

Vérification bibliographique

NC

COMPARAISONS DE METHODES

Méthode précédente,
autre méthode utilisée
dans le laboratoire

NC

ROBUSTESSE

Données bibliographiques

Liée aux réactifs. Respect de la péremption

Résultats

Rien à faire

Conclusions et
dispositions :

Sans objet

STABILITE

Données
bibliographiques

Liée aux réactifs. Respect de la
péremption
et température de stockage contrôlée

Résultats

Rien à faire

Conclusions et
dispositions :

Sans objet

Les règles d'or

- Portée flexible (entre 2 évaluations) standard A (méthodes démontrées)
- Nomenclature réglementaire
- Référentiels (Rémic 2010, HAS)
- Bibliographie
- Réactifs DMDIV marquage CE
- **Responsable désigné réactovigilance inscrit à l'AFSSAPS**
- Fiches fabricant documentation externe gérée
- Exploitation des E.E.Q. pour le choix

Examens microscopiques

- Personnel qualifié
- Personnel compétent
- Personnel habilité
- Résultats uniformes quelque soit l'observateur
- Aucune référence

Germes, cellules

/champ Grossissement 10x100	Rares	Quelques	Assez Nombreux	Nombreux
Germes	1/10	1	10	>10
Cellules	<1	1 à 4	5 à 30	> 30

Les contrôles internes LAB GTA

06

- Définir les besoins, les exigences et les matériaux en partant des facteurs pouvant intervenir sur les résultats d'analyses en se limitant aux analyses fréquentes (Les 5M)

Evaluation en continu de méthode

- **Programme de contrôle qualité interne**
 - Ensemble des procédures mises en œuvre en interne pour contrôler la qualité des résultats au fur et à mesure de l'exécution des analyses
 - Effectuer des contrôles et garder les traces
- **Participation au programme d'évaluation externe**
 - Contrôles inter-laboratoires de valeur inconnue

Cultures

- **Milieus sélectifs préconisés**
 - Fiche de contrôle du lot du fabricant disponible
 - Traçabilité du lot par patient
 - Contrôle de température de l'étuve
 - Respect du temps d'incubation
 - Participation E.E.Q
 - Contrôle sélectivité avec souches de référence (identifiées par CNR)

Trousse de recherche qualitative **exemple Toxines *Clostridium difficile***

- **Test unitaire immuno-enzymatique avec contrôle interne vérifiant la migration correcte de l'échantillon**
- **Contrôle externe positif à utiliser lors de l'ouverture du coffret vérifiant les réactifs associés diluant, conjugué et substrat**

Traçabilités des troussees

- Traçabilité du lot et contrôle
- Traçabilité du lot par patient
- Métrologie minuteur
- Métrologie température enceintes thermostatées
- Métrologie balance parfois pesée de l'échantillon (50 mg Rotavirus)

Réactifs pour test unitaire

- **Traçabilité : date de réception et de péremption et contrôles bimensuels à l'aide des souches de collection identiques à celles de l'identification et antibiogramme pour :**
 - Oxydase de Kowacs contrôlé par souches *E. coli* et *P. aeruginosa*
 - Catalase souches *S. aureus* et *E. faecalis*
 - Urée-indole par souches *E. coli* et *Y. enterocolitica*

Immun sérums

- **Contrôle par souches de référence à chaque détermination car pas de contrôle interne avec les sérums qui ont une date de péremption longue**
 - *Salmonella enteritidis* (OMA, O 9, HG,m)
 - *Salmonella thyphi murium* (OMA, O 1,2-4,5, H1,i)
 - *Shigella sonnei, flexneri*

Conclusion analytique

- Choisir la méthode préconisée par nos pairs
- Respecter scrupuleusement les modes opératoires et le prouver
- Vérifier les facteurs de criticité (5M)
- Nous ne sommes pas laboratoire de l'AFSSAPS nous devons juste pouvoir rappeler les patients après une alerte de l'AFSSAPS et faire une déclaration à l'ARS

POST-ANALYTIQUE

Biothèque pourquoi

- Examens complémentaires
- Matériau de référence interne pour contrôle interne de qualité et comparaison de produits et fournisseurs
- Comparaisons souches intra et inter patients
- Médico-légal après acte chirurgical

Biothèque comment

- **Sérothèque post-analytique un an -20 °C**
- **Echantillon de biologie moléculaire un an de -20° à -70°C**
- **ADN de -20° à -70°C**
- **Souches non fragiles en tube gélose conservation un an maximum de 18 à 30°C**
- **Souches fragiles en cryobilles de -20° à -70°C**

Biothèque des prélèvements pour examen complémentaire

Prélèvement	Température	Durée	Température	Durée
CBU borate	ambiante	48 h		
Selles, LBA	+ 5°C	48 h		
LCR	+ 5°C	48 h pour PCR	-20°C	1 mois
Humeur aqueuse	- 20°C			
IOA, Biopsie	+ 5°C	48 h	-20°C	1 an

Envoi des souches aux CNR et déclaration obligatoire à l'ARS

- E.coli SHU
- T.I.A.C

Conclusion

- La particularité de la microbiologie est de ne pas travailler sur un analyte mais sur une espèce bactérienne ou virale présentant une variabilité génétique, phénotypique et de viabilité.
- En microbiologie, les renseignements cliniques sont indispensables pour rechercher l'agent pathogène.
- Un prélèvement non conforme fait courir le risque pour le patient
 - d'un traitement non efficace
 - une infection qui va diffuser à bas bruit
 - acquisition de résistance aux anti-infectieux

Références

- **GBEA arrêté 1999, 2011 à venir**
- **Arrêté du 28 janvier 2008 ADR**
- **Guide pratique sur le règlement relatif au transport des matières infectieuses OMS 2009**
- **Norme ISO EN 15189 Exigences particulières concernant la qualité et la compétence**
- **Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des LBM (SH REF 02 Cofrac)**
- **Guide technique d'accréditation en BM (SH GTA 01 Cofrac)**
- **Guide technique d'accréditation de vérification/validation des méthodes en BM (SH GTA 04 Cofrac)**

Références (2)

- Rémic SFM 2010
- Révir S.F.M. 2007 Vivactis
- Les prélèvements bactériologiques au quotidien COLBVH Médicom 2000
- Manuel of clinical microbiology R. Murray and al 2007 ASM
- Précis de bactériologie clinique Jean Freney et coll. ESKA 2007
- Bactériologie Médicale Pratique, JP Flandrois et coll. MEDSI/McGARW-HILL 1998



**Merci de votre écoute
Bienvenue à Troyes**