



UNIVERSITE DE LISALA

**CENTRE INTERUNIVERSITAIRE DE RECHERCHE
PLURIDISCIPLINAIRE (CIREP)
STATUT : UNIVERSITE PUBLIQUE
Web : www.cirep.ac.cd
Email : info@cirep.ac.cd**

Notes du cours de Questions spéciales de Microbiologie et laboratoire

OBJECTIF DU COURS

Se familiariser avec un laboratoire de microbiologie, son équipement et son fonctionnement.

L'objectif de ce document est de les exposer en détail. L'on traitera principalement des activités pratiquées par la majorité des laboratoires de microbiologie

INTRODUCTION

Le rôle du laboratoire de microbiologie est d'assurer le traitement des échantillons de manière appropriée, d'effectuer une analyse de qualité et de fournir un résultat exact et reproductible dans un délai opportun.

Pour satisfaire aux exigences de son rôle, tout laboratoire doit mettre en place un système de gestion de la qualité (ou système de management de la qualité), ce qui exige la définition d'un plan organisationnel et d'une structure de gestion de la qualité couvrant tout le processus, qui débute lors de la prescription de l'analyse et se termine par la prise de décision clinique.

Les exigences du système de qualité applicables à tous les secteurs d'activité du laboratoire de biologie médicale sont décrites dans la norme ISO 15189 ainsi que dans le document de l'OPTMQ intitulé La qualité dans les laboratoires de biologie médicale. Les exigences de ce dernier s'appliquent à tout le contenu de ce document, sauf indications contraires.

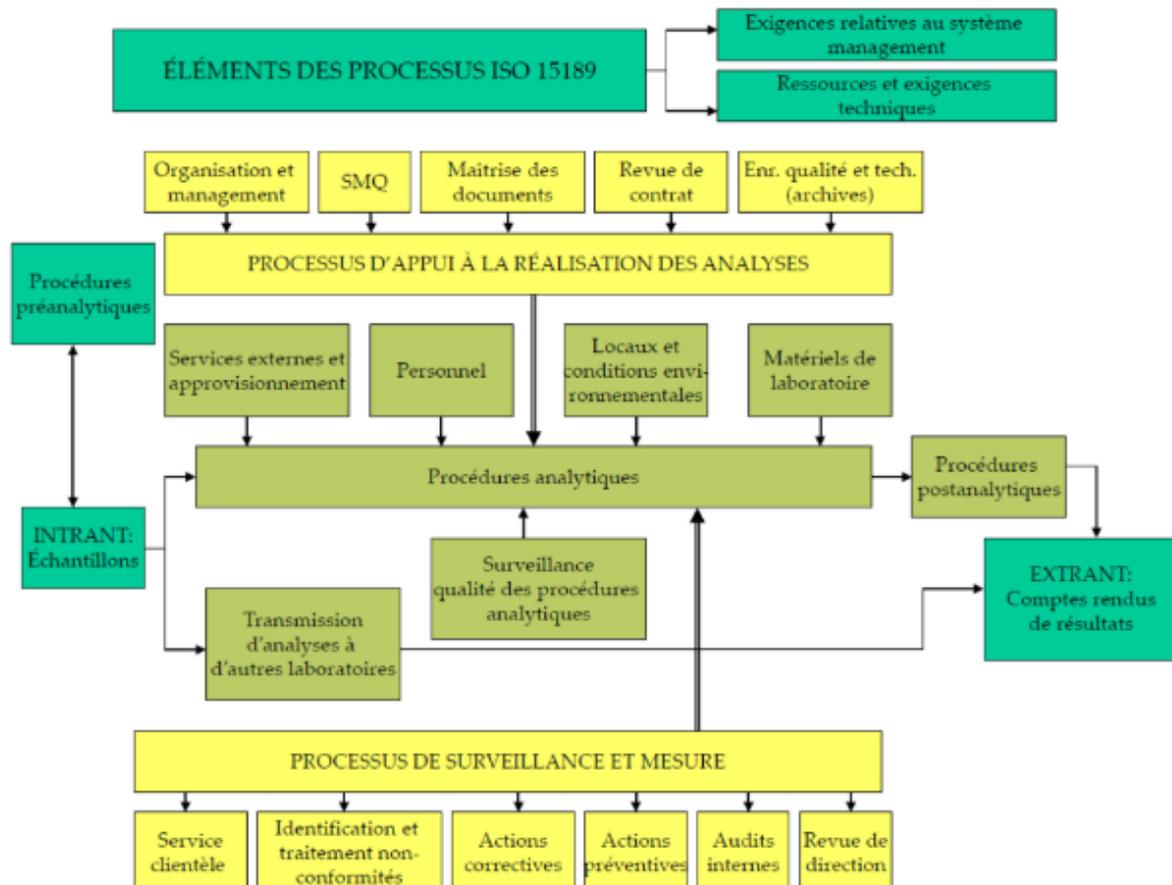
Le secteur de la microbiologie couvre un monde fascinant d'organismes vivants, et en ce sens, la qualité du processus analytique implique des exigences particulières.

C'est en tenant compte de tous ces éléments et en conformité avec les bonnes pratiques de laboratoire que nous présentons ce guide, dont l'objectif est de fournir les lignes directrices pour la mise en place et l'amélioration de procédures de qualité effectuées au laboratoire de microbiologie, dans un environnement sécuritaire et efficace.

1. Système de la qualité

La mise en place d'un système de la qualité au laboratoire implique l'adoption de critères de qualité pour tous les processus associés aux besoins et à la sécurité des patients, des médecins, du personnel et des autorités de réglementation.

Les éléments essentiels de ce système de qualité constituent l'infrastructure nécessaire à la gestion de ses opérations. Le schéma suivant illustre ces éléments :



Source : Extrait d'une présentation de Madame Sergine Lapointe, du Centre de toxicologie de l'Institut national de santé publique du Québec.

Lexique : SMQ : Système de management de la qualité Enr. qualité et tech. : Enregistrement qualité et technique

Note : Le laboratoire, avec le soutien de la direction de l'institution, doit désigner au moins une personne responsable de la qualité qui veillerait à l'application, au suivi et à la mise à jour des exigences énoncées dans son manuel qualité.

2. Mesures de sécurité

Il est essentiel de développer et de mettre en place un programme de prévention des risques liés à la santé et à la sécurité du personnel dans le laboratoire. Les responsables du laboratoire doivent désigner, avec le soutien de la direction de l'institution, au moins une personne responsable de la santé et de la sécurité.

Ce programme de santé et de sécurité au laboratoire, tout en respectant la réglementation en cours, doit prévoir l'élaboration de politiques sur les

risques inhérents au laboratoire de l'établissement concerné, ainsi que des procédures écrites détaillant les mesures à prendre pour gérer ces risques. Les informations devraient être consignées dans un manuel des procédures d'application des mesures de sécurité au laboratoire.

3. Personnel

Le personnel est un élément essentiel du système de la qualité. Les ressources en personnel doivent être adéquates et suffisantes.

Les exigences générales du système de management de la qualité concernant le personnel sont décrites dans le document de l'OPTMQ intitulé La qualité dans les laboratoires de biologie médicale. Nous traitons ici des particularités liées à la microbiologie.

4. Matériel didactique et de référence en microbiologie

Pour l'accomplissement de leur travail quotidien, ainsi que pour l'orientation et la formation continue, les technologistes doivent avoir accès sur place au matériel nécessaire à l'exercice de leurs fonctions, entre autres :

- Des manuels présentant les normes et les guides de pratique reconnues;
- Les guides de bonnes pratiques, les standards de qualité et les lignes directrices des organismes reconnus;
- Des volumes de référence récents;
- Des planches, des atlas ou des logiciels nécessaires à la lecture et à l'interprétation de l'analyse (p. ex. : images représentant les microorganismes, les parasites, etc.);
- Une collection de lames servant à l'identification de microorganismes, parasites, etc.;
- Les sites en ligne pertinents (voir les annexes 1 et 2); ou
- Toute autre source d'information pertinente.

5. Gestion de la documentation

Dans un système de la qualité, la documentation fait référence aux politiques, aux processus, aux procédures et aux enregistrements. Une politique de gestion de la documentation doit établir une hiérarchie documentaire et définir les lignes directrices quant aux responsabilités sur le plan de la rédaction, de la révision et de l'approbation de tout document.

Le laboratoire doit définir, documenter et mettre à jour les procédures de maîtrise de tous les documents et informations (de sources internes et externes) qui constituent sa documentation.

Les procédures doivent être mises en application. Bien que tous les membres du personnel doivent connaître les politiques et les processus concernant les activités qu'ils effectuent, ce document s'adresse au laboratoire de microbiologie, et nous nous limiterons donc à une brève description des exigences relatives aux procédures et aux enregistrements.

6. Prélèvement aux fins d'analyse de microbiologie

Les procédures relatives au prélèvement des échantillons de microbiologie doivent maintenir l'intégrité de l'échantillon. L'obtention d'un échantillon de qualité est à la base de tout résultat d'analyse exact et cliniquement significatif.

a) Manuel de prélèvement des échantillons

Un manuel de prélèvement des échantillons, tenu à jour et décrivant les exigences préanalytiques en regard du prélèvement, sera fourni à toute personne ou tout établissement soumettant des échantillons pour analyse.

Le manuel doit décrire au moins les éléments suivants :

- Les conditions cliniques (pré ou post antibiothérapie, stade de la maladie, interférences médicamenteuses ou autres, etc.) relatives au patient et ayant une incidence sur l'analyse;
- La méthode de prélèvement (site de prélèvement, instructions pour la collecte de l'échantillon, interférences, etc.);
- Le milieu de transport approprié ou le contenant à utiliser (lorsque pertinent);
- Le délai et les conditions de conservation et de transport (lorsque pertinent);
- Les renseignements à inscrire sur le formulaire d'analyse ou l'échantillon (p.
- Ex. : l'origine de l'échantillon, le site anatomique précis, la nature du spécimen, l'heure et la date du prélèvement, les renseignements cliniques pertinents, etc.);
- Les analyses pouvant être demandées en « STAT »;

- Les analyses pouvant être « de routine » ou effectuées sur demande spéciale, selon la nature du spécimen;
- Les critères d'acceptation ou de rejet des échantillons.

b) Prélèvement pour les techniques de mise en culture

Les procédures relatives au prélèvement des échantillons de microbiologie pour la mise en culture doivent tenir compte des exigences de survie des organismes recherchés.

c) Prélèvement pour les échantillons fixés

Les instructions concernant le prélèvement doivent maintenir l'intégrité des structures recherchées.

d) Prélèvement pour les analyses immunologiques ou moléculaires

Les instructions techniques concernant le prélèvement pour les analyses immunologiques ou moléculaires doivent viser le maintien de l'intégrité du marqueur recherché.

Note : L'Association des médecins microbiologistes-infectiologues du Québec (AMMIQ) a publié des guides de pratique pour le diagnostic des infections causées par les virus influenza A et B et pour la sérologie de l'hépatite.

e) Prélèvement avec écouvillons

Les écouvillons sont utilisés pour le prélèvement de plusieurs types de spécimens de microbiologie. Il est crucial que les personnes qui effectuent les prélèvements connaissent les différents écouvillons et utilisent celui qui est approprié pour l'analyse demandée.

Note : Les écouvillons munis d'une tige en bois peuvent contenir des produits toxiques qui risquent d'inactiver le virus de l'Herpès simplex et d'interférer avec certaines méthodes d'identification de l'Ureaplasma.

f) Prélèvement effectué par le patient

Lorsque le prélèvement est effectué par le patient lui-même (urine, selles, expectorations, etc.), celui-ci doit recevoir un feuillet d'instructions détaillant la méthode de prélèvement ainsi que de conservation et de transport de l'échantillon.

De plus, une personne qualifiée remettra au patient le matériel requis et lui expliquera adéquatement la procédure à suivre.

g) Milieux de transport pour les techniques de mise en culture

Afin de permettre l'isolement des germes recherchés, il est impératif d'assurer la viabilité des organismes durant le transport pour les échantillons de microbiologie destinés à la culture.

Note : L'Association des médecins microbiologistes-infectiologues du Québec (AMMIQ) a publié des guides de pratique pour les cultures suivantes : voies respiratoires inférieures, pus superficiels, selles, gorge, sécrétions vaginales, urines, et infections à *Streptococcus pyogènes* ou streptocoque bêta-hémolytique du groupe A70.

7. Conservation et transport des échantillons de microbiologie

a) Le milieu de transport approprié et le contenant à utiliser ainsi que le délai et les conditions de conservation et de transport des échantillons doivent être documentés.

Ces informations doivent figurer dans le manuel de prélèvement. Les milieux de transport sont conçus pour préserver et maintenir l'intégrité de l'échantillon pour la période qui s'écoule entre la collecte et le traitement par le laboratoire.

La conservation et le transport des échantillons de microbiologie sont souvent cruciaux pour la qualité de l'analyse.

Le technologiste médical qui travaille en microbiologie ou qui effectue les prélèvements devrait connaître les conditions d'utilisation des différents milieux de transport, les limitations qui s'appliquent et les interférences possibles.

Les points qui suivent décrivent les critères d'utilisation pour différents milieux de transport.

✓ Particularités concernant les virus

Les milieux de transport pour virus sont conçus pour prévenir le dessèchement, maintenir la viabilité des cellules durant le transport et prévenir la surcroissance des bactéries contaminantes.

Notes :

Les milieux de Hanks ou de Eagle avec inhibiteurs sont le plus souvent utilisés.

- Les milieux de transport utilisés pour le prélèvement bactériologique sont inadéquats pour les virus et pour le Chlamydia.
- Un milieu au sucrose-phosphate-glutamate contenant une solution d'albumine bovine (BSA=bovine serum albumin) est fréquemment utilisé comme milieu de transport pour le Chlamydia, Mycoplasma et Rickettsia.

✓ **Particularités concernant les champignons**

Le délai de transport n'est pas un facteur critique pour la survie des champignons dans les échantillons cliniques. De façon générale, il est suggéré de conserver au sec les échantillons secs (cheveux, squames, etc.) et d'ajouter quelques gouttes de sérum physiologique afin de conserver l'humidité des petits échantillons humides (p. ex. : les biopsies, etc.).

b) Milieux de transport pour la biologie moléculaire

L'intégrité du marqueur recherché doit être maintenue durant le transport au laboratoire. Les fabricants de sondes génétiques et de systèmes d'amplification (PCR, etc.) recommandent ou fournissent généralement l'écouvillon et le milieu de transport spécifique à utiliser pour les échantillons analysés au moyen de leur système d'analyse.

c) Milieux de conservation pour la recherche de parasites intestinaux

Lorsqu'un échantillon de selles fraîches ne peut être analysé dans un délai de 30 minutes pour des selles liquides, de 1 heure pour des selles semi-solides et de 24 heures pour des selles solides, il est nécessaire d'utiliser un milieu de conservation contenant un fixateur.

Il existe plusieurs fixateurs pouvant être utilisés pour conserver un échantillon de selles en vue d'une recherche de parasites. Chacun de ces milieux a des avantages et des désavantages, et le laboratoire de microbiologie devra choisir le milieu le plus compatible selon sa technique d'analyse. Il est particulièrement important de vérifier que le fixateur ne cause pas d'interférences lorsqu'une technique immunologique est utilisée par le laboratoire.

d) Transport de matières infectieuses

Pour le transport de matières infectieuses, vous pouvez consulter, outre les documents de l'OPTMQ, Le Règlement sur le transport des marchandises

dangereuses), accessible sur le site Internet de Transports Canada : <https://www.tc.gc.ca/fra/tmd/clair-tdesm-211.htm>

Note : Pour obtenir plus d'information sur les exigences liées aux délais et aux conditions de conservation générales ainsi que sur le transport des échantillons et de matières infectieuses, veuillez consulter le document de l'OPTMQ intitulé Transport et conservation des échantillons dans le domaine de la biologie médicale.

8. Réception et traitement des échantillons

Le laboratoire doit enregistrer, à la réception, tous les échantillons qu'il reçoit, et noter dans un registre (papier ou électronique) l'heure et la date de réception et de prélèvement si celles-ci n'ont pas été notées au préalable. Tout renseignement additionnel pertinent doit être enregistré. L'identité de la personne ayant reçu les échantillons devrait également être enregistrée.

Avant de procéder à l'analyse, le technologiste médical doit s'assurer que l'échantillon reçu est conforme aux critères de qualité déterminés pour l'examen.

La vérification de la qualité de l'échantillon de microbiologie est une étape cruciale quant à la qualité du résultat.

a) Critères d'acceptation ou de rejet des échantillons de microbiologie

Une politique sur les critères d'acceptation ou de rejet d'un échantillon doit être établie par chaque laboratoire. Une procédure doit définir les étapes à suivre en cas de non-conformité d'un échantillon. La production de résultats d'analyse représentatifs de l'état clinique du patient est directement liée à la qualité de l'échantillon.

Les éléments suivants devraient être compris dans l'élaboration de la politique sur les critères d'acceptation ou de rejet d'un échantillon :

- La spécificité du site de prélèvement (p. ex. : oreille externe, moyenne ou interne);
- La conformité avec les exigences de la méthode de prélèvement, du délai de conservation et du transport de l'échantillon pour l'analyse demandée;

- L'identification adéquate de l'échantillon, la présence des deux identifiants requis (nom, prénom et numéro d'identification propre au patient) ainsi que les directives additionnelles (lorsque requises);
- La pertinence du spécimen clinique en regard de l'analyse demandée;
- L'échantillon unique (p. ex. : LCR, pièce chirurgicale, etc.);
- L'intégrité de l'échantillon.

Lorsque la qualité de l'échantillon n'est pas acceptable ou que l'identification du patient est douteuse, l'échantillon est rejeté (voir note). Il faut alors rédiger un rapport qui indique que l'analyse n'a pas été effectuée parce que l'échantillon était non-conforme, et en aviser le demandeur.

Le laboratoire doit conserver dans un registre, papier ou électronique, l'origine et la raison de la non-conformité d'un échantillon qui a été rejeté. L'on devrait analyser périodiquement ces données afin de déceler les causes d'erreurs, de recommander des solutions et, ainsi d'améliorer le service.

Attention :

- Lorsqu'il s'agit d'un échantillon unique ou d'une situation de menace vitale pour le patient, le technologiste médical utilise son jugement dans l'application de ces exigences et met tout en œuvre pour éviter de refuser l'échantillon, l'objectif étant la primauté du bien-être du patient.
- Si pour des raisons exceptionnelles, liées au bien-être du patient, un échantillon ne satisfaisant pas aux critères d'acceptabilité est tout de même analysé, le rapport d'analyse doit indiquer la nature du problème et, le cas échéant, devrait comprendre un addenda contenant toutes les informations susceptibles d'avoir un impact sur l'interprétation clinique du résultat par le médecin.

9. Contrôle de la qualité des procédures analytiques

Dans le laboratoire de microbiologie, le contrôle de la qualité englobe les mesures mises en place pour assurer l'exactitude et la précision du résultat des différentes analyses effectuées.

Le technologiste médical, en collaboration avec le médecin microbiologiste-infectiologue, s'assure que chaque méthode d'analyse est assortie d'un système de contrôle de la qualité reconnu et adéquat.

a) Critères généraux

Le programme de contrôle de la qualité des procédures analytiques doit respecter au moins les critères suivants :

- Les procédures analytiques doivent être validées, documentées et approuvées. Si des procédures analytiques internes sont utilisées, elles doivent être validées de manière appropriée pour l'utilisation prévue et parfaitement documentée.
- Il doit exister une procédure pour toutes les techniques d'analyse.
- Toute modification apportée à une technique doit être validée, datée, documentée et approuvée.
- Le laboratoire doit concevoir des systèmes de contrôle interne de la qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue.
- Les résultats des contrôles doivent être enregistrés, datés et paraphés. Ils doivent faire l'objet d'une évaluation et d'un suivi périodique effectués par le responsable. Cette information doit être transmise au personnel.
- Lorsqu'un résultat du contrôle de la qualité est non conforme, des actions correctives doivent être apportées, documentées et révisées par une personne responsable.
- L'on devrait mettre en place un mécanisme de traçabilité pour pouvoir suivre chaque étape de l'analyse (lorsqu'applicable).

b) Enregistrement d'une non-conformité

Le technologiste médical signale tout mauvais fonctionnement du matériel (réactifs, équipements, souches de contrôle, etc.) ou toute situation potentiellement dangereuse (p. ex. : une erreur technique).

L'enregistrement d'une non-conformité sert à décrire et à répertorier objectivement les problèmes susceptibles de survenir dans le laboratoire et qui ont une incidence sur le service rendu au patient ou la sécurité du

personnel. Il sert aussi à consigner la cause et à noter la correction immédiate et/ou l'action corrective apportée.

L'analyse de l'information recueillie dans l'enregistrement permet d'évaluer la nature des problèmes et d'améliorer la qualité du service. Pour obtenir plus amples informations sur le contrôle des non-conformités, vous référer au document de l'OPTMQ intitulé La qualité dans les laboratoires de biologie médicale.

10. Contrôle externe de la qualité

Le laboratoire de microbiologie doit participer à un programme d'évaluation externe de la qualité pour toutes les procédures analytiques qu'il offre.

Lorsqu'il n'existe pas de programme d'évaluation externe de la qualité pour une ou plusieurs procédures analytiques, le laboratoire devrait mettre en place une procédure d'évaluation de la conformité. Le laboratoire peut, dans ce cas, participer à un programme de comparaison interlaboratoires pour évaluer la conformité de ces procédures.

Les résultats sont évalués périodiquement par le personnel désigné et, le cas échéant, des actions correctives sont mises en œuvre. Ces résultats sont transmis au personnel et une discussion a lieu avec celui-ci.

Les échantillons fournis lors de ces programmes devraient être analysés et traités de la même façon que les échantillons provenant du patient.

Le contrôle externe de la qualité et le système de comparaison interlaboratoires sont des outils utiles pour la formation continue du personnel. Le personnel des différents quarts de travail devrait y participer.

11. Équipements

Les équipements sont une composante importante du processus analytique. Malgré la performance accrue des fonctionnalités des équipements, le technologiste médical doit en connaître le fonctionnement et demeurer vigilant quant à leur utilisation.

a) Exigences générales

Les équipements de laboratoire doivent être conformes aux spécifications se rapportant à l'analyse concernée. La vérification de cette conformité doit être faite lors de l'installation ainsi qu'au cours de l'utilisation régulière.

Pour obtenir de plus amples informations, vous référer au document l'OPTMQ intitulé La qualité dans les laboratoires de biologie médicale.

b) Entretien préventif et contrôle de la qualité

Le laboratoire doit avoir un programme d'entretien préventif et de contrôle de la qualité pour les équipements. Le calendrier doit respecter au minimum les recommandations du fabricant ainsi que d'autres références pertinentes.

c) Documentation relative à chaque équipement

Une documentation appropriée doit être établie pour chaque appareil. Celle-ci devrait contenir les indications suivantes¹ :

- L'identification, unique, de chaque équipement d'analyse et de son logiciel;
- L'identification du fabricant et de la personne contact ainsi que le numéro de téléphone du fournisseur;
- la date de mise en service;
- Les vérifications de la conformité de l'équipement aux spécifications exigées pour l'analyse, effectuées lors de l'installation, de l'usage de routine et après une réparation, ainsi que les enregistrements qui en découlent;
- Les procédures et instructions à jour concernant l'utilisation et le fonctionnement de l'équipement, dont le manuel du fabricant;
- Les procédures quant au contrôle de la qualité et aux enregistrements qui en découlent;
- Les procédures d'entretien préventif et les instructions d'entretien nécessaires pour garantir le bon fonctionnement, ainsi que les enregistrements qui en découlent.

Pour obtenir de plus amples informations, vous référer au document de l'OPTMQ intitulé La qualité dans les laboratoires de biologie médicale.

d) Exigences spécifiques à certains équipements

Les points qui suivent décrivent les exigences spécifiques concernant certains des équipements faisant partie directement ou indirectement du processus analytique dans un laboratoire de microbiologie.

e) Équipements à température contrôlée

Les équipements dont le contrôle de la température a une incidence sur l'analyse ou sur la conservation du matériel de laboratoire doivent être munis d'un thermomètre. L'exactitude des thermomètres doit être vérifiée annuellement à l'aide d'un thermomètre de référence, lequel doit être certifié régulièrement.

f) Équipements volumétriques : micro-pipette, anse calibrée, distributeur, etc.

L'exactitude et la précision des équipements volumétriques doivent être vérifiées avant la première utilisation, après chaque activité d'entretien préventif ou correctif, et selon des intervalles spécifiques à l'usage – au minimum une fois l'an.

g) Microscope et micromètre oculaire

Le technologiste médical doit effectuer l'ajustement et l'entretien du microscope qu'il utilise. L'ajustement du microscope (éclairage de Köhler) doit être effectué régulièrement. Un microscope ajusté et entretenu de façon optimale est un élément essentiel à l'exactitude et à la précision de tout examen microscopique.

L'utilisation d'un micromètre oculaire (placé dans l'oculaire de mesure) est incontournable pour mesurer la taille d'un protozoaire ou de tout autre organisme. Ce facteur est souvent déterminant pour l'identification de celui-ci.

h) pH mètre

L'ajustement précis du pH des solutions est très important en microbiologie. Il est primordial de respecter les recommandations du fabricant concernant l'entretien et l'ajustement de l'équipement, et de respecter les exigences décrites dans le manuel d'instruction du produit.

12. Réactifs

Pour cette section du document, les réactifs comprennent tous les produits utilisés au cours d'une analyse de microbiologie (p. ex. : colorants, produits chimiques, trousse commerciales, agents antimicrobiens, etc.).

Un contrôle positif et négatif effectué à l'aide de souches de contrôle doivent être effectués pour assurer l'efficacité des solutions chimiques et biologiques, des réactifs et des antisérums utilisés en microbiologie.

Les exigences générales concernant le contrôle de la qualité des réactifs sont décrites dans le document de l'OPTMQ intitulé La qualité dans les laboratoires de biologie médicale.

a) Gestion des réactifs en microbiologie

Une politique et une procédure de gestion des réactifs doivent être établies et appliquées. Elles doivent, sans y être limitées, comprendre :

- La vérification des réactifs avant leur utilisation, ce qui comprend l'étiquetage, l'inscription de la date de réception, de préparation (lorsqu'applicable), d'ouverture et de péremption, ainsi que l'identification de chacune des personnes participant au processus;
- Le maintien et l'utilisation de souches de contrôle reconnues et acceptées afin de vérifier les réactifs, les disques d'antibiotiques, etc. ;
- La détermination de la fréquence d'utilisation des contrôles ;
- La conservation des produits conforme aux recommandations du fabricant;
- La prise de connaissance et la conservation des monographies des produits et des certificats d'analyse;
- La gestion des produits périmés;
- L'évaluation des produits équivalents avant leur utilisation.

b) Antimicrobiens

On utilise les antimicrobiens pour déterminer leur action in vitro sur les microorganismes infectieux isolés à partir d'un échantillon.

Les antimicrobiens doivent être conservés de façon appropriée afin que soient maintenues leur intégrité et leur activité antimicrobienne optimale.

Lorsque les cartouches de disques ou les bandelettes d'antimicrobiens sont retirées de leur emballage initial scellé, elles doivent être conservées dans un contenant étanche renfermant un agent de dessiccation approprié. Les contenants doivent avoir atteint la température de la pièce avant leur ouverture.

c) Colorants

Pour assurer la qualité des colorants :

- vérifier leur apparence chaque jour;
- Les filtrer (p. ex., cristal violet, safranine) lorsqu'il y a présence d'un sédiment ou d'un précipité;
- évaluer leur intégrité physico-chimique et réactionnelle à l'aide de contrôles ;
- les conserver de façon à respecter leur intégrité physico-chimique.

d) Antisérums

Les antisérums achetés sur le marché devraient être testés avec les souches de contrôle correspondantes recommandées par le fabricant à chaque nouveau lot et tous les 6 mois.

e) Trousses commerciales

La date de péremption doit être inscrite sur la trousse commerciale. Le contrôle de la qualité devrait être effectué selon les recommandations du fabricant et à chaque réception d'un lot. Les composants d'une trousse ne peuvent être échangés avec ceux d'une autre trousse portant un numéro de lot différent.

f) Eau de laboratoire

Le laboratoire de microbiologie devrait connaître le type d'eau utilisé dans chacune de ses procédures et activités (exemple : type I, II ou III selon la norme CLSI). La qualité de l'eau devrait être contrôlée périodiquement.

L'Institut national de Santé publique du Québec a produit un guide de pratique sur la qualité de l'eau décrivant les lignes directrices à respecter concernant la norme la plus utilisée dans un laboratoire clinique. Ce guide est disponible en version intégrale à l'adresse suivante :

http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/143_QualiteEauLaboratoire.pdf

13. Souches de contrôle de référence

Les souches de contrôle de référence sont un élément essentiel à tout programme de contrôle de la qualité en microbiologie et leur utilisation doit être documentée.

a) Choix des souches de contrôle

Les souches de contrôle doivent avoir des caractéristiques représentatives de leur espèce, être pures et être stables.

Le nombre de repiquage des souches de contrôle primaires devrait être documenté et, de façon générale, limité à trois. Éviter les repiquages multiples en série.

Outre les souches de référence de l'ATCC (American Type Culture Collection), les souches de contrôle connues et acceptées peuvent avoir une des provenances suivantes :

- contrôle externe de la qualité;
- Origine clinique, confirmée par un laboratoire de référence;
- Disques commerciaux; ou
- Organismes identifiés et de phénotypes stables isolés de patients.

b) Conservation des souches de contrôle

La méthode et la durée de conservation des souches de contrôle doivent viser le maintien des caractéristiques de l'espèce et minimiser les possibilités de contamination.

La congélation des souches de contrôle à -70°C demeure la méthode la plus utilisée pour la conservation à long terme. Les souches de contrôle peuvent se conserver indéfiniment à cette température.

14. Milieux de culture**a) Critères généraux**

- Chaque lot de milieux de culture doit être contrôlé, et sa capacité nutritive doit être vérifiée avec des souches de contrôle connues et acceptées
- Les critères de performance des milieux de culture devraient être documentés à partir de références reconnues.

Note : Le document du CLSI M22 est une référence reconnue qui peut être utilisée pour établir la procédure à suivre pour vérifier la performance de chacun des milieux.

- Les résultats des contrôles de la qualité doivent être enregistrés, datés, paraphés et suivis.

b) Milieux de culture préparés sur place

Le laboratoire devrait établir, pour la préparation et le contrôle de la qualité des milieux de culture préparés sur place, des procédures qui tiennent compte des éléments suivants :

- Chaque lot de milieu de culture préparé sur place devrait être contrôlé, et les paramètres suivants devraient être vérifiés :
- Le pH final;
- L'apparence;
- Le format, le volume, l'épaisseur lorsque pertinent (p. ex., le milieu pour Kirby-Bauer);
- La contamination;
- La performance.
- Conserver un enregistrement de la quantité de milieu préparé, de la source, du numéro de lot, de la méthode de stérilisation, de la date de préparation, du pH, de la date de péremption, et du nom de la personne qui a préparé le milieu.

15. Mise en culture et identification bactérienne

Les procédures doivent être écrites pour chacun des types de spécimen selon les divers sites corporels. Elles doivent être rédigées en collaboration et en accord avec le spécialiste responsable du secteur. Elles doivent être appuyées par des références reconnues et adaptées aux exigences des microorganismes recherchés ainsi qu'à l'origine et à la nature du spécimen.

a) Procédures relatives à l'identification bactérienne

Ces procédures devraient comprendre, sans toutefois s'y limiter :

- La méthode d'ensemencement de l'échantillon ainsi que l'examen direct lorsque requis;
- La sélection et le nombre de milieux de culture à ensemer, ainsi que l'environnement approprié en fonction du type de spécimen, du site anatomique, de l'agent recherché et des renseignements cliniques ;
- La liste des microorganismes recherchés pour chacun des types de spécimen et des sites anatomiques ;
- Les critères et méthodes d'évaluation et d'identification des organismes recherchés : par exemple, l'examen microscopique (Gram, coloration spéciale, etc.) ou l'épreuve biochimique et sérologique;

- Le cheminement critique menant à l'identification, décrit en détail;
- La méthode de standardisation pour l'évaluation et l'interprétation du frottis, clairement décrite et appliquée;
- La méthode de standardisation pour l'évaluation quantitative des colonies, clairement décrite et appliquée;
- Les épreuves de sensibilité aux antibiotiques établies selon des normes reconnues (p. ex. : CLSI);
- le contrôle de la qualité;
- L'interprétation des résultats;
- Les interférences et autres précautions particulières;
- Les résultats critiques et la procédure à suivre pour la transmission du résultat;
- Les résultats nécessitant l'émission d'un rapport préliminaire;
- Les références bibliographiques, la date d'entrée en vigueur et la date de révision de la procédure;
- L'identité du rédacteur, du réviseur et de la personne qui approuve la procédure.

Note : L'Association des médecins microbiologistes infectiologues du Québec (AMMIQ) a publié des guides de pratique pour les cultures suivantes : voies respiratoires inférieures, pus superficiels, selles, gorges, sécrétions vaginales, urines, et infections à Streptococcus pyogènes ou streptocoque bêta- hémolytique du groupe A.

b) Contrôle de la qualité des systèmes automatisés d'identification bactérienne

Les procédures de contrôle de la qualité des systèmes automatisés d'identification bactérienne doivent être effectuées selon les recommandations du fabricant et des références pertinentes.

Note : Pour détecter d'éventuelles erreurs dans la banque de données intégrée à l'appareil, il est important d'utiliser son jugement et de s'assurer qu'il y a concordance avec toutes les autres informations liées à l'identification.

16. Épreuves de sensibilité aux antibiotiques

Le laboratoire de microbiologie doit adopter des méthodes d'analyse validées et approuvées pour les épreuves de sensibilité aux antibiotiques (antibiogrammes), que ce soit par méthode de dilution en milieu liquide ou en milieu solide, par méthode de diffusion en gélose ou par méthode automatisée.

Des procédures doivent être écrites et mises en application pour les épreuves de sensibilité aux antibiotiques et ce, pour l'ensemble des services du laboratoire de microbiologie.

Les critères d'interprétation et de contrôle de la qualité des antibiogrammes doivent être issus d'une documentation médicale reconnue et doivent être appliqués.

a) Contrôle de la qualité des antibiogrammes

Les procédures de contrôle de la qualité des épreuves de sensibilité aux antibiotiques ont pour objectif de contrôler :

- La précision et l'exactitude des procédures des épreuves de sensibilité aux antibiotiques;
- Les facteurs de variation techniques et biologiques de l'activité des agents antimicrobiens pour une bactérie spécifique;
- La compétence de la personne qui effectue l'analyse et la lecture des résultats.

b) Sélection du milieu de culture pour antibiogramme

Le milieu solide Mueller-Hinton Agar (MHA) et le milieu liquide Mueller-Hinton (MHB) supplémenté en cations divalents (calcium et magnésium) sont recommandés par le CLSI pour le test de sensibilité aux antibiotiques pour les bactéries pathogènes à croissance rapide (non fastidieuses ou non exigeantes).

Les procédures de préparation et de contrôle de la qualité du milieu MHA devraient satisfaire aux critères de qualité définis dans les documents du CLSI ou d'autres références reconnues (p. ex. : épaisseur uniforme de 4 mm, délai d'utilisation, stérilité, pH, etc.)

Autres méthodes manuelles de réalisation d'antibiogrammes

Il existe plusieurs autres méthodes d'épreuves de sensibilité aux antibiotiques

(p. ex. : méthodes de dilution en gélose ou en milieu liquide, méthode epsilon-métrique, etc.). Des procédures validées, approuvées et appuyées par des références reconnues doivent être rédigées pour chacune de ces épreuves.

c) Méthodes automatisées de réalisation d'antibiogrammes

L'équipement utilisé pour les méthodes automatisées de réalisation d'antibiogrammes est soumis aux exigences de qualité de l'équipement décrites à la section 13.0, ainsi qu'aux exigences relatives au contrôle de la qualité décrites à la section 12.0 de ce document.

Les forces et les faiblesses du système automatisé en fonction de la méthode utilisée et des résultats prévus doivent être documentées, et cette information doit être appuyée par des publications scientifiques reconnues. Le technologiste médical doit être en mesure de maîtriser toute l'information relative à l'équipement qu'il utilise.

Le contrôle de la qualité des appareils doit être établi en respectant de façon minimale les exigences du fabricant.

d) Vérification des résultats de sensibilité aux antibiotiques

Il est important de vérifier chacun des résultats avant d'émettre un rapport de sensibilité aux antibiotiques.