

Chapitre 11

Contrôle de qualité des milieux et réactifs

Chaque laboratoire doit s'assurer de la qualité des milieux et des réactifs qu'il utilise. Contrôler la qualité signifie choisir des matières premières satisfaisantes, préparer les milieux selon les formules approuvées ou les instructions du fabricant et utiliser des souches de référence parfaitement caractérisées pour vérifier le milieu préparé.

A. Contrôle de qualité des milieux

1. Aspects dont on tiendra compte pour le contrôle de qualité des milieux

Chaque lot de milieu préparé avec des ingrédients séparés ou chaque numéro de lot de milieu déshydraté doit être testé pour déterminer les caractéristiques suivantes :

- Stérilité
- Capacité à permettre la croissance du pathogène cible
- Capacité à produire des réactions biochimiques appropriées

Stérilité

Incuber un tube ou une boîte de Pétri de chaque lot de milieu passé à l'autoclave ou stérilisé au filtre pendant toute une nuit à 35 ou 37°C et l'examiner pour détecter les contaminants.

Capacité à permettre la croissance de l'organisme cible

- Pour des milieux sélectifs : utiliser au moins une souche pour tester la capacité à permettre la croissance du pathogène ciblé (par exemple, pour la gélose MacConkey (MAC), une souche de *Shigella* telle que *S. flexneri*). Il faut également noter si cette souche produit les réactions biochimiques ou des couleurs adéquates sur le milieu (voir ci-après).

Capacité à produire des réactions biochimiques appropriées

- Pour des milieux sélectifs : utiliser au moins un pathogène et un non pathogène pour tester la capacité du milieu à faire la distinction entre les organismes ciblés et les organismes en compétition (par exemple, pour MAC, un organisme qui ne fermente pas le lactose tel que *S. flexneri* et un organisme qui le fermente tel que *E. coli*).
- Pour des milieux supports de réactions biochimiques : utiliser au moins un organisme qui produira une réaction positive et au moins un autre avec réaction négative (par exemple, pour le milieu à l'urée, un organisme producteur d'uréase tel que *Proteus* et un organisme non producteur d'uréase tel que *E. coli*).

2. Méthodes de contrôle de qualité du milieu

Lorsque l'on teste les capacités de croissance, on peut préparer une suspension diluée pour ensemer le milieu et éviter ainsi l'utilisation d'un inoculum trop important. Un petit inoculum permet de s'assurer que le milieu permet la culture d'un petit nombre de bactéries provenant d'un échantillon. Voici un exemple de protocole pour le contrôle de qualité du milieu :

- La souche témoin est inoculée dans un bouillon non sélectif (gélose trypticase soja par exemple) et elle est cultivée pendant 24 heures.
- Afin de préparer un inoculum standard pour tester des milieux sélectifs et inhibiteurs, préparer une dilution au 1:10 d'une culture d'une nuit dans un bouillon non sélectif. Si l'on teste un milieu non sélectif, préparer une autre dilution au 1:10 (pour donner une dilution au 1:100 du bouillon).
- Un tube ou une gélose de chaque milieu doivent être inoculés avec l'inoculum standardisé de la souche témoin. Lorsqu'on teste des milieux sélectifs, il faut inoculer en même temps un milieu non sélectif tel que la gélose d'infusion de cœur, afin de pouvoir effectuer une comparaison.
- Les boîtes de Pétri serontensemencées en utilisant les dilutions au 1:10 ou au 1:100 préparées comme décrit plus haut (utiliser si possible une anse calibrée), puis mises en culture par stries. La même anse peut être utilisée pour tous les contrôles de la qualité ; à défaut d'utiliser une anse calibrée, il est important de toujours utiliser la même anse pour les ensemencements.

3. Sources des souches de contrôle de qualité

On peut obtenir des souches adéquates pour le contrôle de qualité de plusieurs manières. Un laboratoire peut utiliser des souches isolées d'échantillons cliniques ou d'échantillons d'assurance de qualité, à condition que les souches soient bien caractérisées par toutes les méthodes disponibles (biochimiques, morphologiques, sérologiques, moléculaires, etc.). Un grand nombre de laboratoires achètent des souches de contrôle de qualité auprès de collections officielles de cultures, telles que la collection nationale des cultures de types ou National Collection of Type Cultures (Public Health Laboratory Service, London NW9, England) ou la collection de cultures des États-Unis ou American Type Culture Collection (ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852). Les souches de contrôle de qualité peuvent aussi être achetées à des compagnies commerciales comme Lab M (Topley House, 52 Wash Lane, Bury, BL9 6AU, England).

B. Contrôle de qualité des réactifs

Comme pour les autres produits utilisés pour les tests, les réactifs, qu'ils soient achetés ou préparés au laboratoire, doivent porter une étiquette indiquant clairement la date à laquelle ils ont été ouverts pour la première fois ainsi que si possible la date de péremption. Chaque réactif doit être testé pour vérifier

l'obtention des réactions attendues. Si le réactif est un produit rare, cher ou encore difficile à obtenir comme par exemple les antisérums agglutinants, il n'est pas obligatoire de le jeter après la date de péremption. Si l'on peut vérifier que le réactif est encore suffisamment sensible ou spécifique après des procédures normales de contrôle de qualité, le laboratoire peut alors indiquer, sur l'étiquette du réactif, la date de vérification de la qualité du réactif. Tous les réactifs doivent faire l'objet à intervalle régulier d'un contrôle de qualité pour vérifier qu'aucune détérioration n'a eu lieu.

Contrôle de qualité des antisérums : méthode d'agglutination sur lame

Pour le contrôle de qualité de l'antisérum, utiliser deux souches ou plus (l'une positive et l'autre négative) pour tester leurs caractéristiques d'agglutination. Noter les résultats de toutes les réactions. Voir ci-après un exemple de procédure typique de contrôle de qualité.

- Déposer une goutte (environ 0,05 ml) de chaque antisérum sur une lame ou une boîte de Pétri. Déposer également une goutte de sérum physiologique à 0,85 % sur chaque lame ou boîte pour tester chaque souche et voir si elle est rugueuse ou autoagglutinable.
- Pour chaque souche témoin, préparer une suspension de turbidité dense (McFarland #2 ou 3, voir Tableau 11-1) en solution saline normale avec une culture de 18 à 24 heures récoltée de manière aseptique sur une gélose non sélective (par exemple, une gélose d'infusion de cœur ou une gélose trypticase soja).
- Ajouter une goutte de suspension bactérienne à l'antisérum et à la solution saline. Bien mélanger avec un applicateur, une tige en verre ou une anse d'inoculation. Faire basculer la lame d'avant en arrière pendant une minute.
- Lire la réaction d'agglutination à la lumière indirecte et sur fond noir. Pour que le test soit interprétable, le témoin en solution saline ne doit pas agglutiner.

Le degré d'agglutination doit être lu et noté de la manière suivante :

<u>Pourcentage d'agglutination</u>	<u>Noter la réaction de la manière suivante</u>
100	4+
75	3+
50	2+
25	1+
0	négatif

C. Avantages de l'acquisition centralisée des milieux et réactifs

L'acquisition centralisée des milieux et réactifs auprès d'un laboratoire de référence ou du Ministère de la Santé présente plusieurs avantages :

- Permet l'achat de grandes quantités d'un seul lot de milieux ou de réactifs pouvant ensuite être répartis en aliquots plus petits pour distribution aux laboratoires de province ou de districts. La mesure aussi efficace par rapport aux coûts (remises pour commandes importantes, baisse éventuelle des coûts d'expédition, moins de gaspillage dû aux produits périmés).
- Le contrôle de qualité sera plus efficacement réalisé dans le laboratoire central, évitant par là la duplication du contrôle avec les laboratoires de province ou de district. Si un milieu ou un réactif est jugé inadéquat, le lot sera retourné au fabricant avant même d'avoir été distribué aux autres laboratoires.
- La standardisation des méthodes entre les laboratoires de tous les niveaux est facilitée par l'utilisation d'un seul lot de milieux.

Tableau 11-1. Composition des standards de turbidité McFarland

Standard de turbidité numéro	Dihydrate de chlorure de baryum (1,175 %), en ml	Acide sulfurique (1 %), en ml	Densité approximative correspondante de bactéries/ml
0,5	0,5	99,5	1 . 10 ⁸
1	0,1	9,9	3 . 10 ⁸
2	0,2	9,8	6 . 10 ⁸
3	0,3	9,7	9 . 10 ⁸
4	0,4	9,6	12 . 10 ⁸
5	0,5	9,5	15 . 10 ⁸
6	0,6	9,4	18 . 10 ⁸
7	0,7	9,3	21 . 10 ⁸
8	0,8	9,2	24 . 10 ⁸
9	0,9	9,1	27 . 10 ⁸
10	1	9,0	30 . 10 ⁸