

CRITERA POUR L'ACCRÉDITATION DE LA MICROBIOLOGIE DANS LES LABORATOIRES MÉDICAUX

Préparé par : Comité consultatif SADCAS - MLAS	Approuvé par : PDG de SADCAS	Date d'approbation : 2023-02-28 Date d'entrée en vigueur : 28-02-2023
---	-------------------------------------	--

Table des matières

	Page
1. OBJECTIF ET PORTÉE	3
2. ABRÉVIATIONS.....	3
3. EXIGENCES GÉNÉRALES ET TECHNIQUES	3
4. RAPPORT DES RÉSULTATS	8
5. ÉQUIPEMENTS DE LABORATOIRE ET RÉACTIFS.....	9
6. SÉCURITÉ ET HÉBERGEMENT EN LABORATOIRE ET CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES	9
7. RÉFÉRENCES.....	10
BILAN AMENDEMENT.....	11

1. OBJECTIF ET PORTÉE

L'objectif de ce document est de définir les exigences générales, techniques et spécifiques à satisfaire aux laboratoires de microbiologie médicale nécessitant une accréditation ISO 15189.

2. ABRÉVIATIONS

AST	Test de sensibilité aux antimicrobiens
PPE	Équipement de protection individuelle
BSC	Cabinet de sécurité biologique

3. EXIGENCES GÉNÉRALES ET TECHNIQUES

3.1.1. Le champ d'action du laboratoire doit indiquer quels services suivants sont fournis sur place et lesquels ne le sont pas :

- (i) Bactériologie
- (ii) Mycobactériologie
- (iii) Mycologie
- (iv) Parasitologie
- (v) Tests de susceptibilité aux drogues

3.1.1 Pour les procédures effectuées sur site, le laboratoire doit indiquer dans quelle mesure ces procédures d'examen sont réalisées :

- (i) Examens directs : Macroscopie / microscopie
- (ii) Culture : Aérobie, Anaérobie, Micro-aérophile
- (iii) Identification : limitée ou étendue
- (iv) Méthodes de dépistage
- (v) Méthodes de confirmation

3.1.2 Lorsque des échantillons sont envoyés à un autre laboratoire pour examen complet ou partiel, ces informations doivent être fournies par le laboratoire référent.

3.2 PROCÉDURES D'EXAMEN :

Des procédures détaillées seront disponibles pour l'examen direct, la culture, l'identification et les tests de susceptibilité aux médicaments pour chaque espèce/organisme testé et seront aussi étendues que nécessaire.

3.2.1 BACTÉRIOLOGIE

3.2.1.1 Liquide céphalorachidien (LCR)

- (i) Les échantillons de LCR doivent être traités immédiatement après réception.
- (ii) L'apparence macroscopique de l'échantillon soigné et du surnageant doit être enregistrée.
- (iii) Effectuez un comptage différentiel des cellules.
- (iv) Centrifugez l'échantillon de LCR et effectuez une coloration de Gram sur le dépôt.
- (v) La culture de routine de l'échantillon doit permettre la récupération des organismes associés à la maladie méningée, en particulier ceux nécessitant des exigences de croissance rigoureuses (par exemple, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*).
- (vi) Tous les isolats doivent être identifiés.
- (vii) Les antigènes bactériens peuvent être détectés par des tests rapides tels que les tests d'agglutination au latex.

3.2.1.2 Cultures sanguines :

- (i) Le type de milieu de culture sanguine doit être sélectionné en fonction du patient et du volume de sang à utiliser, par exemple des flacons pédiatriques, en résine ou en hémoculture standard.
- (ii) Le milieu de culture sanguine doit être à température ambiante avant l'inoculation.
- (iii) Les hémocultures ne doivent pas être réfrigérées pour le transport, et doivent être incubées immédiatement à 37°C pour faciliter la récupération de :
 - Organismes aérobies
 - Organismes anaérobies (lorsque cela est indiqué)
 - Organisme dépendant du CO₂
 - Des organismes méticuleux.
- (iv) Hémocultures manuelles :
 - Les bouteilles doivent être examinées quotidiennement pour détecter des signes de croissance pendant le nombre requis de jours d'incubation.
 - Les bouteilles doivent être agitées pendant les 24 premières heures d'incubation pour une récupération optimale des organismes méticuleux.
 - Les cultures négatives doivent être sous-cultivées sur le milieu approprié dans les 24 heures, après 48 heures, et une sous-culture terminale doit être réalisée.
 - Tous les isolats doivent être identifiés.
- (v) Les systèmes automatisés de culture sanguine doivent suivre les recommandations du fabricant pour l'inoculation et l'incubation.

3.2.1.3 Aspirants, cultures de plaies, tissus et pus.

- (i) Le pus entier ou tissu est préféré à l'utilisation de prélèvements pour la collecte des échantillons.
- (ii) Des procédures spéciales doivent être mises en place pour prévenir la perte d'organismes anaérobies, par exemple l'utilisation d'un milieu de transport approprié.
- (iii) Les colorations de Gram doivent être pratiquées régulièrement et signalées.
- (iv) Des milieux de culture pour la récupération des organismes aérobies et anaérobies doivent être utilisés de manière routinière.
- (v) Lorsque cela est approprié, des milieux et méthodes sélectifs doivent être utilisés pour récupérer des anaérobies stricts.

3.2.1.4 Isolation anaérobie

- (i) Les échantillons pour examen anaérobie doivent être disposés d'arrangements adéquats pour prévenir ou minimiser l'exposition à l'oxygène.
- (ii) Tous les spécimens anaérobies doivent être transportés dans un milieu de transport approprié.
- (iii) La méthode utilisée pour obtenir un environnement de culture anaérobie doit être spécifiée, par exemple dans un pot anaérobie.
- (iv) Les cultures sur un milieu solide doivent être placées immédiatement dans un environnement anaérobie.
- (v) Le milieu liquide utilisé pour les anaérobies doit être spécifié, c'est-à-dire le bouillon de thioglycolate, le milieu de viande cuite.
- (vi) La méthode utilisée pour contrôler la qualité de l'environnement anaérobie doit être précisée : (organisme témoin, indicateurs anaérobies commerciaux).
- (vii) Le test de sensibilité à la diffusion du disque n'est généralement pas réalisé car il n'existe pas de directives CLSI disponibles, des méthodes alternatives telles que le test E, la dilution du bouillon ou la dilution de l'agar doivent être utilisées.
- (viii) Les organismes témoins doivent être testés à chaque lot de tests de susceptibilité réalisés.

3.2.1.5 Échantillons respiratoires

- (i) Lors de la réalisation de cultures d'expectorations, toutes les étapes doivent être suivies pour obtenir un échantillon « vrai » d'expectorations.
- (ii) Les échantillons d'expectorations doivent être analysés avant la culture.
- (iii) Des procédures seront disponibles pour l'identification de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*.
- (iv) Lorsque cela est indiqué, d'autres bacilles à gram négatif doivent être identifiés.
- (v) Des procédures appropriées seront disponibles pour l'isolement et l'identification d'autres agents pathogènes, par exemple *Staphylococcus aureus*, les espèces de *Cryptococcus*, *Candida albicans*.

3.2.1.6 Échantillons d'urine

- (i) Dans la mesure du possible, les échantillons d'urine doivent être examinés dans les 2 heures suivant l'urination ou conservés au réfrigérateur si cela n'est pas possible.
- (ii) Des décomptes quantitatifs ou qualitatifs de cellules, des cultures et des décomptes en colonie doivent être réalisés.
- (iii) Les milieux de culture utilisés devraient permettre l'isolement et l'identification des organismes gram positifs et négatifs.
- (iv) Lorsque cela est approprié, des échantillons d'urine contenant de grandes quantités de globules rouges doivent être examinés pour détecter la présence d'ovules de Bilharzia (*Schistosoma haematobium*).

3.2.1.6.1 Échantillons fécaux et prélèvements rectaux

- (i) Des procédures de routine doivent être utilisées permettant l'isolement rapide et l'identification des agents pathogènes entériques chez les patients diarrhéens et chez les porteurs asymptomatiques
- (ii) L'enrichissement et les milieux sélectifs doivent permettre la récupération de petits nombres d'agents pathogènes entériques.
- (iii) Lorsque cela est indiqué, des procédures doivent être disponibles pour la récupération des bactéries suivantes :
 - *Vibrio cholera*
 - *Yersinia enterocolitica*
 - *Espèces de Campylobacters*. (conditions de culture microaérophile)
 - *Espèces d'Aeromonas*

3.2.1.6.1 Cultures par prélèvement pour *Neisseria gonorrhoeae* :

- (i) Les échantillons de col de l'utérus, de l'urètre ou d'autres types appropriés doivent être inoculés directement sur un milieu sélectif approprié ou soumis dans un milieu de transport approprié permettant une récupération optimale des organismes.
- (ii) Les milieux de culture et les moyens d'inoculation et d'incubation seront optimaux pour l'isolement de *Neisseria*.

3.2.2 PARASITOLOGIE :

- (i) Un manuel de procédure sera disponible dans la zone de travail et inclura des instructions pour la collecte correcte des échantillons, les méthodes utilisées ainsi que les critères d'identification des OVUS et des parasites.

- (ii) Les échantillons doivent être examinés à un état frais, notamment pour détecter la présence de trophozoïtes.
- (iii) Lorsque les échantillons ne peuvent pas être examinés immédiatement, des mesures doivent être prises pour préserver l'échantillon, par exemple
 - a. Préparation directe à l'eau avec ou sans coloration à l'iode.
 - b. Une procédure de concentration reconnue.
 - c. Préparation colorée de façon permanente (par exemple coloration à l'hémotoxiline)
 - d. Coloration modifiée de Ziehl Neelsen pour *Cryptosporidia*.
- (iv) Si disponible, l'utilisation d'un micromètre oculaire calibré peut être utilisée pour déterminer la taille des ovules, larves, kystes ou trophozoïtes.
- (v) Le matériel de référence doit être disponible à l'établi et doit inclure
 - a. Atlas imprimé des parasites et des ovules.
 - b. Illustrations et descriptions similaires
 - c. Supports permanents et glissières
- (vi) Ce qui suit s'applique aux analyses sanguines pour le *Plasmodium* :
 - a. Des films épais et fins doivent être fabriqués et examinés
 - b. Les films doivent être préparés immédiatement à partir de sang veineux anticoagulé.
 - c. Une méthode de coloration appropriée doit être utilisée, par exemple les teintures Wright, Giemsa.
 - d. Le pH du tampon utilisé pour les colorations doit être vérifié, c'est-à-dire 7.2.
 - e. Pour les films épais, au moins 100 champs doivent être examinés avant qu'un rapport sans parasite visible ne soit donné.
 - f. Le pourcentage de parasitémie doit être établi.

3.2.2.5 MYCOLOGIE

Techniques d'isolement et d'identification.

- (i) Le laboratoire doit effectuer des procédures de dépistage préliminaires telles que des préparations humides directes et des colorations.
- (ii) L'utilisation de milieux de culture sélectifs appropriés (par exemple DTM ou Mycosel) doit être utilisée pour la croissance et l'isolement des dermatophytes et des mycoses systémiques.
- (iii) Des antibiotiques doivent être ajoutés au milieu de culture pour supprimer la prolifération de contaminants bactériens et fongiques.
- (iv) Les plages de température pour les tests de croissance, d'isolement et de différentiel pour les dermatophytes et les mycoses systémiques doivent être définies dans les méthodes de culture.
- (v) Les procédures appropriées pour les tests différentiels utilisés pour l'identification fongique doivent être appliquées en fonction du type de travail effectué par le laboratoire et doivent inclure :
 - a. Tests biochimiques, manuels et/ou automatisés
 - b. Formation de chlamydiospores
 - c. Exigences spécifiques de croissance de température
 - d. Culture des diapositives/blocs

3.2.4 MYCOBACTÉRIOLOGIE :

Procédures diagnostiques.

- a) Le criblage des échantillons peut inclure la microscopie tuberculose, le test GeneXpert ou le test de la sonde en ligne (LPA).
- b) Des méthodes de coloration appropriées telles que Ziehl Neelsen, Fluorescence ou Kinyoun doivent être utilisées.
- c) Les témoins positifs et négatifs doivent être inclus dans tous les lots lors de la microscopie, de la culture ou des tests de sensibilité aux médicaments.
- d) Une procédure de décontamination sera utilisée pour préparer les échantillons à la culture de la tuberculose. Le type de décontaminant à utiliser doit être indiqué dans la procédure.
- e) La méthode de concentration utilisée pour la microscopie et la culture des mycobactéries dans des échantillons d'expectorat et non d'écrachats doit être indiquée.
- f) L'utilisation d'un milieu de culture spécifique pour l'isolation primaire doit être précisée (pour les systèmes manuels ou automatisés)
- g) La durée de l'incubation des cultures avant qu'un rapport négatif ne soit émis doit être clairement indiquée.
- h) Tous les isolats mycobactériens suspectés doivent être vérifiés pour détecter leur acidité.
- i) L'identification de l'espèce doit être effectuée et la ou les méthodes spécifiques utilisées indiquées.
- j) Les souches de référence doivent être maintenues comme témoins pour les tests d'identification et de susceptibilité.
- k) Des tests de sensibilité doivent être réalisés sur tous les isolats pertinents de MTB, en utilisant une méthode convenue.

3.2.5 TESTS DE SUSCEPTIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES (AST) :

- a) Types de tests de susceptibilité :
 - I. Test de susceptibilité discale, c'est-à-dire méthode Kirby Bauer.
 - II. Concentration inhibitrice minimale (CMI), c'est-à-dire microdilution du bouillon, ETEST®.
 - III. Des tests pour prédire la résistance à l'oxacilline (résistance médiée par mecA) pour *Staphylococcus* doivent être réalisés selon une méthode spécifiée.
- b) Contrôle qualité de l'AST :
 - I. Les souches de contrôle qualité reconnues de sensibilité connue doivent être testées au moins chaque semaine conformément aux directives CLSI (ou à d'autres organisations reconnues internationalement, par exemple EUCAST).
 - II. Un inoculum standardisé doit être utilisé.
 - III. Pour Disc AST, les tailles spécifiques des zones de l'organisme témoin doivent être mesurées, enregistrées et utilisées pour

déterminer la sensibilité ou la résistance de l'agent antimicrobien.

- IV. Pour les tests de dilution du bouillon, la concentration et l'identité de tous les médicaments dilués doivent être appliquées.
- V. Tout AST qui n'a pas réussi le contrôle qualité ne sera pas rapporté pour les résultats des patients tant qu'il n'a pas été démontré qu'il a réussi le contrôle qualité sur une période d'au moins 5 jours consécutifs.

4.0 RAPPORT DES RÉSULTATS :

4.1 Bactériologie

- a) Des rapports préliminaires seront publiés lorsque les résultats finaux ne sont pas disponibles dans les 48 heures.
- b) Les résultats négatifs finaux doivent normalement être disponibles dans un délai de 48 à 72 heures (selon le type d'échantillon)
- c) Les résultats de la susceptibilité au médicament doivent être déclarés sensibles ou résistants.
- d) Les valeurs des tests MIC doivent être rapportées ainsi que l'interprétation.

4.2 Mycologie :

- a) Les résultats préliminaires des examens microscopiques seront mis à la disposition des cliniciens demandeurs.
- b) Les résultats finaux seront disponibles dans un délai de 4 à 6 semaines.

4.3 Mycobactériologie :

- a) L'examen microscopique des échantillons par la base aérienne doit indiquer la quantité de bases aériennes dans le frottis conformément aux directives de l'IUAT.
- b) Lorsque cela est approprié, le rapport doit faire référence à des spécimens insuffisants en quantité et en qualité
- c) Les rapports de microscopie et GeneXpert doivent être délivrés dans les 24 heures suivant la réception de l'échantillon.
- d) Des résultats intermédiaires seront publiés pour les spécimens positifs en culture.

5.0 ÉQUIPEMENTS DE LABORATOIRE ET RÉACTIFS

5.1. Équipement

- a. Le laboratoire doit être équipé de tout l'équipement nécessaire à la prestation des services.
- b. L'équipement doit être vérifié lors de l'installation et avant utilisation.
- c. L'équipement doit être étiqueté de manière unique.
- d. Le manuel d'opérateur ou SOP doit être disponible et doit être utilisé par du personnel formé ou autorisé.
- e. Les registres pour chaque équipement doivent être tenus conformément à la norme ISO.

- f. Le laboratoire doit disposer d'une procédure documentée pour l'étalonnage des équipements (SADCAS TR 09 : Critères pour effectuer des contrôles d'étalonnage et intermédiaires sur les équipements utilisés dans les installations accréditées)
- g. Les laboratoires effectuant des tests de culture de tuberculose doivent disposer d'une armoire de sécurité biologique (BSC).
- h. Les laboratoires qui préparent des réactifs et des milieux de culture internes doivent disposer des équipements suivants :
 - Équilibre
 - Un pH-mètre et des tampons.
 - Autoclave (taille adaptée à la charge de travail)

5.2. Réactifs / Consommables

- a) Le laboratoire doit disposer d'une procédure documentée pour la réception, le stockage, les tests d'acceptation et la gestion des stocks des réactifs et consommables.
- b) Des registres doivent être tenus pour chaque réactif / consommable qui contribue à la performance des tests.
- c) Lorsque le laboratoire prépare en interne des réactifs ou des supports de culture, les dossiers doivent inclure la ou les personnes responsables de la préparation, la date de préparation, la date d'expiration ainsi que les tests d'acceptation.

6.0 SÉCURITÉ EN LABORATOIRE ET CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES :

- a) L'équipement de protection individuelle (EPI) doit être disponible et adapté à la classe d'organisme manipulé. Au minimum, il faut inclure des gants, des masques, des lunettes de protection et des blouses de laboratoire.
- b) Les spécimens et techniques de culture impliquant des organismes de classe III et IV, par exemple les mycobactéries, les pathogènes fongiques systémiques, c'est-à-dire l'histoplasma, doivent toujours être manipulés dans un BSC approprié.
- c) Les centrifugeuses doivent être capables de contenir des aérosols bio-dangereux et des déversements, c'est-à-dire des seaux de centrifugeuse avec couvercle.
- d) Des désinfectants appropriés doivent être disponibles dans la zone de travail.
- e) Les laboratoires doivent disposer d'un espace suffisant pour permettre une exécution sûre et compétente du travail.
- f) Les BSC doivent être vérifiés quotidiennement/hebdomadaire ou lors de l'utilisation pour garantir un bon fonctionnement.
- g) Il doit y avoir une séparation adéquate des activités lors des tests de tuberculose en laboratoire.

7.0 RÉFÉRENCES

- ISO 15189 : Laboratoires médicaux – Exigences particulières en matière de qualité et de compétence

- SADCAS TR 09 : Critères pour effectuer des contrôles d'étalonnage et intermédiaires sur les équipements utilisés dans les établissements accrédités.

ANNEXE - DOSSIER D'AMENDEMENT

Statut de la révision	Changement			Approuvé par	Date d'entrée en vigueur
	Page	Clause / Sous-clause	Description du changement		
Numéro 1	-	-	-	PDG	2023-02-28

