



Contrôle de qualité Interne: Manipulation et conservation des souches bactériennes de référence

ID code: SOP_Souches CQ_V01 Version: 01
Valide à partir du: 23/04/2021

Objectif:	Déterminer les différentes étapes à suivre pour conserver et manipuler les souches bactériennes de référence, depuis leur réception jusqu'à leur utilisation pour les différents contrôle de qualité interne en bactériologie.
------------------	--

Cette POS remplace la version de:	
Modifications:	
Créé/ révisé par:	11/04/21 Dr Lamia Kanzari Date Titre Prénom Nom <i>Signature (sur l'original imprimé)</i>
Vérifié par:	23/04/2021 Dr IlhemBoutiba Date Titre Prénom Nom <i>Signature (sur l'original imprimé)</i>
Autorisé par:	23/04/2021 Dr IlhemBoutiba Date Titre Prénom Nom <i>Signature (sur l'original imprimé)</i>



Contrôle de qualité Interne: Manipulation et conservation des souches bactériennes de référence

ID code:	SOP_Souches CQ_V01	Version: 01
Valide à partir du:	23/04/2021	

Table des matières

1	Contexte	3
2	Principe	3
3	Abréviations.....	4
4	Responsabilités	4
5	Matériel.....	4
5.1	Equipements.....	4
5.2	Petit matériel	5
5.3	Réactifs	5
6	Procédure.....	5
6.1	Réception des souches de contrôle de qualité de référence..... Erreur ! Signet non défini.	
6.2	Ouverture des ampoules en verre, reconstitution et mise en culture des souches lyophilisées	5
6.3	Préparation et conservation des cultures stocks:.....	9
6.4	Mise en culture des souches congelées pour les utiliser dans les contrôles de qualité quotidiens (figure 1)	10
7	Contrôle de qualité.....	11
8	Mesures de sécurité particulières	12
9	Annexe.....	12
9	Autres documents et lien utilisés	12
10	Liste de signatures.....	13



Contrôle de qualité Interne: Manipulation et conservation des souches bactériennes de référence

ID code: SOP_Souches CQ_V01

Version: 01

Valide à partir du: 23/04/2021

1 Contexte

Le contrôle qualité interne (CQI) en microbiologie requiert l'utilisation d'organismes de contrôle vivants, comportant des réactions prévisibles pour vérifier que les colorants, les réactifs et les milieux fonctionnent et réagissent correctement. Ces contrôles doivent être facilement disponibles et conservés correctement, à la fois sous la forme de souches congelées et de souches de travail. Pour chaque réaction, les différents organismes présentant soit des résultats positifs soit des résultats négatifs devraient être testés.

Les organisations suivantes offrent des souches de référence:

- ATCC – American Type Culture Collection (Etats-Unis d'Amérique)
- NTCC – National Type Culture Collection (Royaume Uni)
- CIP – Collection de l'Institut Pasteur (France).
- DSMZ—German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH

2 Principe

Les souches de référence achetées sont en général sous forme lyophilisées. Une fois reconstituées, ensemencées et leur pureté vérifiée, elles sont utilisées pour le contrôle de qualité interne de toutes les étapes de mise en culture, d'identification bactérienne et d'étude de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques.

La méthode de conservation choisie doit causer le minimum de perte de microorganismes, assurer la stabilité de leurs caractères biochimiques et de résistance aux antibiotiques, prévenir la contamination et doit assurer une conservation de longue durée à un coût acceptable.

Le laboratoire doit donc maintenir un nombre de souches suffisant permettant la vérification de tous les milieux de culture et des systèmes d'analyses. Cette procédure détaille les différentes méthodes de reconstitution des souches lyophilisées, de conservation et de manipulation de ces souches au laboratoire pour leur utilisation dans les différents CQI.



Contrôle de qualité Interne: Manipulation et conservation des souches bactériennes de référence

ID code: SOP_Souches CQ_V01

Version: 01

Valide à partir du: 23/04/2021

3 Abréviations

Abréviation	Nom complet
CQI	Contrôle de qualité interne
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH
ATCC	American Type Culture Collection
NCTC	National Collection of Type Culture
CIP	Collection de l'Institut Pasteur (France).
PSM	Poste de sécurité microbiologique
EPP	Equipements de protection individuelle
BCC glycérol	Bouillon cœur cerveau avec 15 à 20 % de glycérol
GS	Gélose au sang
GSC	Gélose au sang cuit
ACPD	The Advisory Committee on Dangerous Pathogens

4 Responsabilités

Responsable	Activités
Technicien ou biologiste	Reconstitution et mise en culture des souches lyophilisées pour élaborer un soucier de référence correctement congelé. Organisation du flux de travail pour la subculture et l'utilisation du soucier de référence dans les CQI.
Biologiste responsable de la qualité	Vérification de la bonne application et validation des différentes étapes de cette procédure

5 Matériel

5.1 Equipements

- PSM type II
- Congélateur -80°C
- Congélateur à -20°C
- Réfrigérateur



Contrôle de qualité Interne: Manipulation et conservation des souches bactériennes de référence

ID code: SOP_Souches CQ_V01

Version: 01

Valide à partir du: 23/04/2021

5.2 Petit matériel

- EPP
- Deux lingettes désinfectantes ou tissu imbibé d'alcool à 70%
- Papier absorbant, de la gaze ou de tissu
- Coupe-diamant ou un stylo diamant
- Poubelle à objets tranchants
- Pince
- Pipette Pasteur stérile
- Anses stériles à usage unique
- Bain à glace
- Portoir métallique à culture
- Cryotubes et boîte à cryotubes

5.3 Réactifs

- Alcool à 70%

5.4 Milieux de culture

- BCCglycérol
- GS ou GSC

6 Procédure

Les souches de contrôle de qualité peuvent être délivrées au laboratoire sous forme lyophilisée parfois dans des ampoules en verre. Ces souches lyophilisées doivent être conservées au réfrigérateur entre 4° et 10°C jusqu'à leur ouverture.

6.1 Reconstitution et mise en culture des souches lyophilisées

Si les souches sont lyophilisées dans des ampoules en verre, ces ampoules sont ouvertes dans un poste de sécurité biologique de classe II. Si cela n'est pas possible, le manipulateur doit travailler dans des conditions stériles, porter un équipement de protection individuelle comprenant des gants, des lunettes de sécurité ou une visière, des vêtements de protection, et tenir l'ampoule à l'écart du corps lors de l'ouverture.

La procédure d'ouverture et de mise en culture est la suivante :

- 1- Préparer le matériel nécessaire
- 2- Vérifier l'identification de la culture bactérienne par le numéro de référence inscrit sur le papier à l'intérieur ou l'étiquette sur l'ampoule

Contrôle de qualité Interne: Manipulation et conservation des souches bactériennes de référence

ID code: SOP_Souches CQ_V01

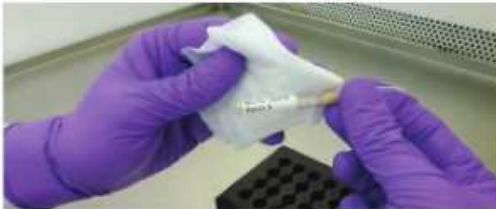
Version: 01

Valide à partir du: 23/04/2021



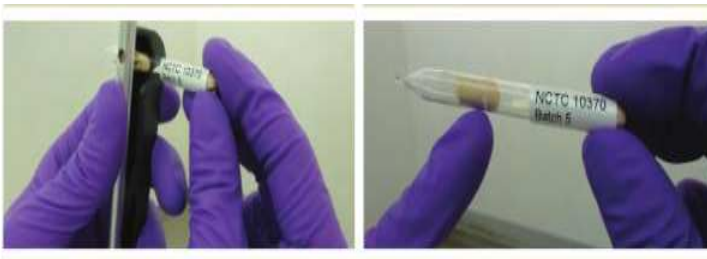
Etape 2

- 3- Nettoyer l'extérieur de l'ampoule à l'aide d'une lingette désinfectante ou d'un tissu imbibé d'alcool à 70%.



Etape 3

- 4- Faire une entaille profonde autour de la circonférence de l'ampoule, en utilisant un coupe-diamant ou un stylo diamant à mi-chemin du tampon en coton. L'ouverture de l'ampoule peut se faire maintenant en «enveloppant et cassant» comme indiqué aux étapes 5 à 8.



Etape 4

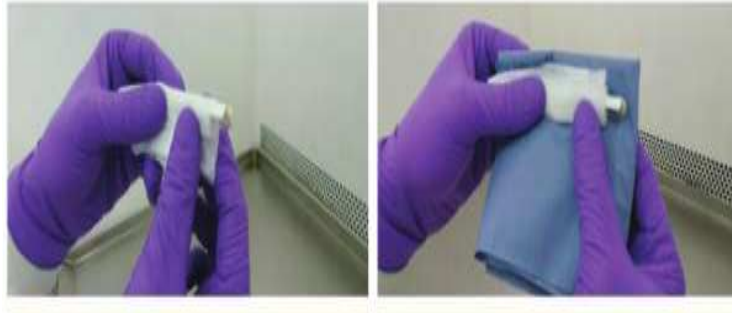
- 5- Envelopper l'ampoule dans une lingette désinfectante ou un mouchoir imbibé d'alcool à 70%
- 6- Ensuite, envelopper-les de papier absorbant, de gaze ou de tissu pour agir comme couche de rembourrage. Cela évite les blessures accidentelles lorsque l'ampoule est ouverte.

Contrôle de qualité Interne: Manipulation et conservation des souches bactériennes de référence

ID code: SOP_Souches CQ_V01

Version: 01

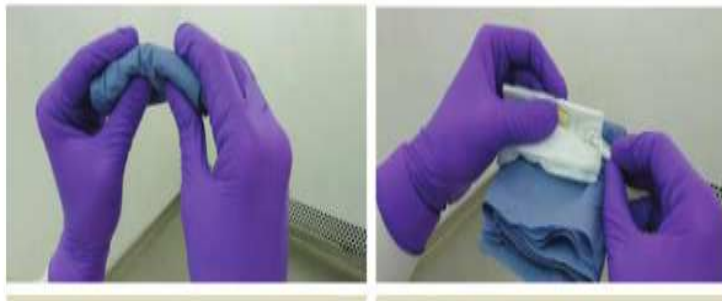
Valide à partir du: 23/04/2021



Etape 6

Etape 5

- 7- Casser l'ampoule tout en enveloppant là où la marque de score a été faite
- 8- Déballer soigneusement l'ampoule car des fragments de verre peuvent être présents dans le tissu. Jeter le mouchoir et l'embout de l'ampoule dans une poubelle à objets tranchants.



Etape 7

Etape 8

- 9- Une fois ouverte, l'air pénètre dans l'ampoule. Cet air sera filtré par le tampon de coton qui peut avoir été en contact avec la culture bactérienne séchée et doit donc être jeté en toute sécurité.
Avant de reconstituer la culture, si le bouchon ne vient pas avec la pointe de l'ampoule → Retirer le bouchon avec une pince
- 10- Pour reconstituer la culture, transférer environ 0,5 ml de bouillon nutritif, dans l'ampoule.

Contrôle de qualité Interne: Manipulation et conservation des souches bactériennes de référence

ID code: SOP_Souches CQ_V01

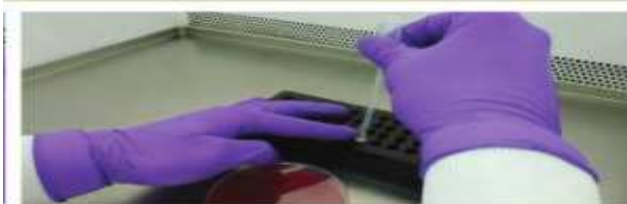
Version: 01

Valide à partir du: 23/04/2021



Etape 10

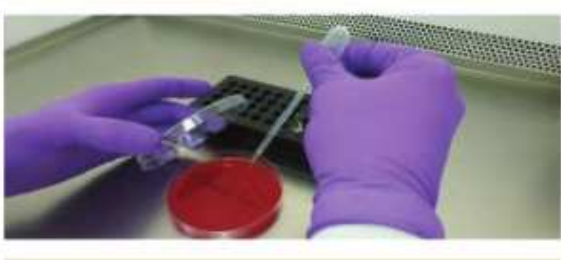
11- Laisser les microorganismes se réhydrater pendant 5 à 10 minutes. Mélanger très soigneusement pour éviter de créer des aérosols ou de faire mousser le contenu. Vérifier que tout le matériel est dissous.



Etape 11

12- Mettre en culture la suspension bactérienne sur un milieu de culture solide approprié (gélose au sang ou gélose au sang cuit) pour faciliter la détection de tout contaminant qui aurait pu être introduit lors de l'ouverture de l'ampoule.

NB : Transvaser par la suite le contenu de l'ampoule dans un cryotube contenant un bouillon cœur cerveau additionné de 15 à 20 % de glycérol (BCC glycérol), préalablement identifié pour une nouvelle utilisation au besoin (au congélateur à -80°C) et jeter l'ampoule usagée dans une poubelle à objets tranchants.



Etape 12

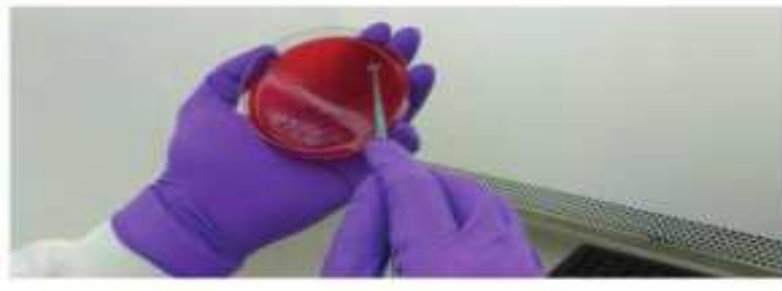
Contrôle de qualité Interne: Manipulation et conservation des souches bactériennes de référence

ID code: SOP_Souches CQ_V01

Version: 01

Valide à partir du: 23/04/2021

13- La plupart des bactéries lyophilisées se développeront en quelques jours, bien que certaines puissent nécessiter une période d'incubation légèrement plus longue que la normale, en raison du processus de conservation.



Etape 13

6.2 Préparation et conservation des cultures stocks :

Une fois la souche bactérienne de référence est isolée et sa pureté vérifiée, un stock de cultures bactériennes doit être préparé et conservé congelées dans des cryotubes contenant un bouillon cœur cerveau additionné de 15 à 20 % de glycérol (BCC glycérol) autoclavé et stérile. Les souches peuvent être indéfiniment conservées si elles sont gardées à une température inférieure ou égale à -70°C . La conservation à -20°C n'est pas recommandée pour une période supérieure à 12 ou 18 mois car certains microorganismes perdront leur viabilité à cette température.

-A partir d'une culture fraîche de 24 h, faire une suspension dans le milieu de congélation (BCC glycérol).

-Répartir la suspension dans des cryotubes préalablement identifiés par la référence de la souche (prévoir un nombre de tubes de telle sorte à avoir un soucier de référence et un soucier de travail). Vortexer pour homogénéiser.

-Préparer un bain de glace en plaçant de la glace dans un récipient en métal étanche et assez grand pour contenir un portoir métallique à culture

- Transférer ensuite les cryotubes dans le congélateur à -80°C en les rangeant dans des boîtes de congélation. En effet, les bactéries portant des gènes de résistance à support plasmidiques doivent être conservées à moins que -60°C (-80°C ect.)



Contrôle de qualité Interne: Manipulation et conservation des souches bactériennes de référence

ID code:	SOP_Souches CQ_V01	Version:	01
Valide à partir du:	23/04/2021		

6.3 Organisation du flux de travail pour la subculture et l'utilisation du soucier de référence dans les contrôles de qualité quotidiens (Figure 1)

- **Chaque mois**, à l'aide d'une anse stérile, racler la partie supérieure du cryotube contenant la souche bactérienne choisie et la transférer sur un milieu non sélectif en faisant attention à ne pas contaminer le haut ou l'intérieur du tube : il s'agit **de la 1^{ière} subculture F1**.
- Refermer le cryotube avant que le contenu ne soit décongelé et le remettre au congélateur. Si l'on opère soigneusement, des prélèvements peuvent être effectués à plusieurs reprises à partir du même tube. **Un tube décongelé ne doit plus être utilisé.**
- **F1** doit être conservée 1 mois au réfrigérateur entre 2-8°C. Pour éviter la dessiccation bien envelopper la boîte par du parafilm.

NB. Pour les organismes exigeants qui ne survivront pas sur les géloses pendant 7 jours, faire un repiquage quotidien de la souche pendant pas plus que 6 jours.

- **Chaque semaine**, à partir de cette culture F1, préparer une **2^{ième} subculture F2** sur une gélose nutritive. F2 est conservée une semaine au réfrigérateur entre 2-8°C.
- **Chaque jour**, à partir de F2, faire un repiquage quotidien **F3** sur un milieu non sélectif. F3 est utilisée pour tous les CQI et jetée le même jour.
- Au bout de 1 mois, F1 est jeté.

Contrôle de qualité Interne: Manipulation et conservation des souches bactériennes de référence

ID code: SOP_Souches CQ_V01

Version: 01

Valide à partir du: 23/04/2021

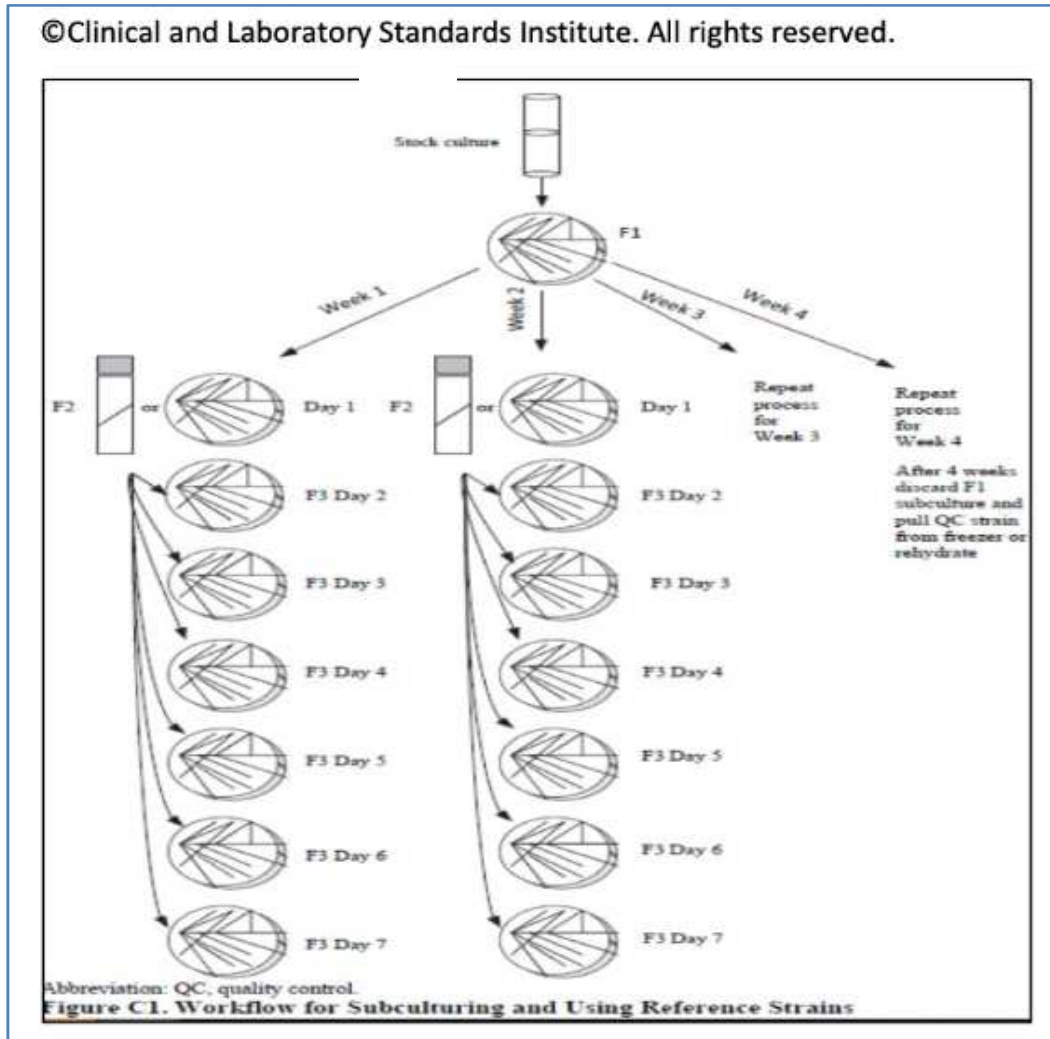


Figure 1: Flux de travail pour la subculture et l'utilisation du soucheur de référence pour les contrôles de qualité internes quotidiens (CLSI)

7 Contrôle de qualité

Vérifier la pureté et l'identification bactérienne de la souche congelée (Gram, oxydase, coagulase, catalase...)



Contrôle de qualité Interne: Manipulation et conservation des souches bactériennes de référence

ID code:	SOP_Souches CQ_V01	Version:	01
Valide à partir du:	23/04/2021		

8 Mesures de sécurité particulières

Toutes les cultures bactériennes doivent être considérées comme potentiellement dangereuses et doivent être ouvertes par des personnes formées aux techniques microbiologiques et familiarisées avec le travail du laboratoire avec les exigences appropriées pour le niveau de biosécurité des cultures.

Les cultures en ampoules doivent être traitées dans un environnement de laboratoire qui convient à la manipulation de microorganismes du groupe de danger ACDP 2 ou 3, selon le cas.

9 Annexes

- How to open an NCTC glass ampoule and reconstitute freeze-dried material.
<https://www.youtube.com/watch?v=V5l28TyzxSY>
- How to open and grow your freeze-dried NCTC strains

10 Autres documents et lien utilisés

- Quality assurance in bacteriology and immunology, Third edition. World Health Organisation. Regional Office for South-East Asia.
- Système de Gestion de la Qualité au Laboratoire - Outil de formation WHO/HSE/IHR/LYO/2009.1. Handbook
- Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI), 2020.
- Biosafety in microbiological and biomedical laboratories , 6th edition, Center for disease control and Prevention, National Institute of Health.



Détermination de la concentration minimale inhibitrice par microdilution en milieu liquide

ID code: SOP_CMI microdilution_V01

Version: 01

Valide à partir du: 14/10/2019

11 Liste de signatures

Lu et informé:

<i>Date</i>	<i>Nom</i>	<i>Signature</i>