

**ANNEXE I**Supplément à toutes les méthodes
Janvier 2003**DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS****OTTAWA****SUPPLÉMENT À TOUTES LES MÉTHODES FIGURANT DANS LE COMPENDIUM
DIRECTIVES GÉNÉRALES EN MICROBIOLOGIE****1. APPLICATION**

Les renseignements suivants sont fournis à titre de complément pour toutes les méthodes qui figurent dans le *Compendium de méthodes* et peuvent être utilisés de concert avec n'importe quelle méthode, à moins d'indications contraires. Ce supplément vise à fournir des renseignements additionnels (p. ex., des sources de matériel, des étapes critiques, des étapes de confirmation ou des conseils utiles, etc).

NOTE : Tout changement important ou appréciable à une méthode doit être approuvé par les auteurs dont le nom figure sur la méthode et/ou par le Comité de méthodes microbiologiques de Santé Canada (aux soins de [Don Warburton@hc-sc.gc.ca](mailto:Don.Warburton@hc-sc.gc.ca)). En cas de doute, adressez-vous à ces personnes.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX**L'utilisation de milieux commerciaux**

Le glossaire (Annexe G des volumes 1 à 3) est fourni à titre d'outil de référence pratique pour les géloses, les bouillons et les autres réactifs utilisés dans le *Compendium de méthodes*. **Il incombe à l'analyste ou au superviseur de laboratoire d'assurer l'efficacité des milieux** préparés à partir des produits disponibles dans le commerce ou constitués à partir d'ingrédients à l'aide des formulations ci-dessous ou des variations de ces formulations.

Il incombe à l'analyste ou au superviseur de laboratoire d'assurer que des **précautions appropriées sont prises lors de manipulations des ingrédients chimiques des milieux**, y compris les produits préparés commercialement, afin d'éviter les blessures possibles en raison d'une inhalation ou d'un contact avec la peau et les yeux ainsi que les effets découlant d'une exposition prolongée.

Antibiotiques inclus dans les milieux commerciaux

La formulation originale de certains milieux comprend l'ajout d'antibiotiques stérilisés par filtration au milieu de base après sa stérilisation à l'autoclave. Les progrès dans la production de milieux commerciaux ont engendré l'ajout, au milieu de base, d'antibiotiques à longue durée de conservation et résistants à la chaleur; il n'est donc pas nécessaire d'utiliser des antibiotiques stérilisés par filtration pour ce produit. L'utilisation de ce genre de produits est acceptable pour les méthodes du *Compendium* lorsque l'on démontre qu'elles sont

équivalentes à la formulation originale, soit grâce aux données fournies par le fabricant soit grâce à des validations internes.

Durée de conservation des milieux

La durée de conservation de certains milieux est indiquée dans les méthodes du Compendium ainsi qu'à l'annexe G. On reconnaît que les milieux commerciaux emploient parfois des composantes stables qui permettent de prolonger la durée de conservation du produit reconstitué. Il est également reconnu que les produits chimiques et les ingrédients provenant de diverses sources peuvent modifier la durée de conservation recommandée. Il incombe à l'analyste ou au superviseur de laboratoire de vérifier et de déterminer la durée de conservation appropriée pour les milieux utilisés dans leur laboratoire.

Milieux comparables

Il est reconnu que des problèmes liés aux fournisseurs, aux fabricants et à la livraison, ou dans le cas d'urgences à court terme, peuvent nécessiter la substitution d'un milieu par un autre. Par exemple, on peut utiliser des boîtes de gélose au sang de cheval au lieu de celles qui sont composées de sang de mouton. Dans ces circonstances, il incombe au superviseur de laboratoire de mettre en oeuvre des mesures adéquates pour s'assurer que l'analyse est fiable ou complète.

Il est également reconnu que d'autres milieux (par exemple les milieux chromogènes) sont parfois plus efficaces et mieux adaptés pour certains aliments ou certaines conditions. Il est possible que ces milieux soient disponibles pendant un certain temps avant d'être incorporés aux méthodes du Compendium. Les nouveaux milieux **doivent** être utilisés de concert avec les milieux recommandés dans les études de validation.

Utilisation des contrôles de culture

Des contrôles négatifs et positifs sont recommandés dans la plupart des méthodes du Compendium. Lorsqu'aucun contrôle ne figure dans les méthodes du Compendium, on recommande l'utilisation de souches appropriées afin de s'assurer de la fiabilité de chaque analyse. Lorsque des souches précises sont recommandées, il est reconnu que celles-ci ne sont pas toujours disponibles dans tous les laboratoires et que le superviseur de laboratoire peut les remplacer par des souches équivalentes si ce remplacement répond aux exigences de la méthode.

Utilisation de réactifs, de trousse d'identification et de tests commerciaux

Il est reconnu que des tests microbiens normalisés, comme l'épreuve de l'indole et l'épreuve de détection de l'oxydase, sont disponibles dans le commerce sous la forme de réactifs, de trousse d'identification et d'épreuves complètes. Ceux-ci ont souvent plus stables à température pièce, sont plus faciles à utiliser et plus fiables que les réactifs et les solutions préparés à l'interne. Il est également reconnu que les trousse d'identification rapide comprennent parfois de nombreuses étapes de confirmation citées dans une méthode. Les réactifs, les trousse d'identification et les épreuves commerciales peuvent remplacer ceux qui figurent dans les méthodes lorsque l'on démontre leur équivalence.

7. PROCÉDURE

Préparation des échantillons

Pesée de l'unité analytique

Des renseignements généraux sont fournis dans chaque méthode, ainsi que dans les annexes F et H. De plus, l'analyste peut tarer soit un bocal de mélangeur soit un sac de stomacher (lorsque l'on se sert du support approprié) sur la balance, avant la pesée de l'unité analytique. L'analyste peut alors prélever l'unité analytique de l'échantillon (conformément aux directives de la méthode ou des annexes F et H), puis la placer dans le mélangeur ou le sac de stomacher taré. L'analyste peut ensuite y ajouter une quantité adéquate de diluant de manière à obtenir une dilution 1:10 avant la macération. L'utilisation du poids est considérée comme un moyen plus fiable d'obtenir la dilution

initiale.

Limites de détection et utilisation de dilutions alternatives

Habituellement, la première dilution recommandée dans les méthodes du Compendium est de 1:10. Afin de répondre aux besoins des clients, nous reconnaissons qu'il pourrait être nécessaire d'accroître la sensibilité d'une méthode et de modifier sa limite de détection. Pour ce faire, les moyens sont les suivants : 1. accroître la quantité analysée (par exemple, effectuer des NPP de 100, 10 et 1 g plutôt que 10, 1 et 0,1 g); 2. réduire la première dilution à 1:5; 3. accroître la quantité étalée en surface sur une gélose (par exemple, étaler 0,2 ml plutôt que 0,1 ml); et 4. accroître le nombre de plaques utilisées pour la première dilution (par exemple, étaler 0,1 ml sur 5 plaques de gélose plutôt que d'utiliser deux plaques de gélose comme on le ferait normalement. On peut utiliser ces méthodes ou d'autres méthodes pour augmenter ou diminuer la limite de détection du moment qu'elles ont été validées adéquatement en laboratoire.

Après la première dilution à 1:10, d'autres dilutions peuvent être effectuées à l'aide d'aliquotes de 9, 10, 90 ou 99 ml (ou des volumes semblables) du diluant.

Numération ou détection des bactéries

Réfrigération des bouillons et des géloses

Les éléments suivants constituent des modifications acceptables des méthodes du Compendium : 1. utilisation d'incubateurs qui deviennent des réfrigérateurs (c'est-à-dire qu'après avoir obtenu la température et le temps d'incubation recommandés, l'incubateur peut automatiquement passer en mode réfrigération); 2. la réfrigération des bouillons ou des plaques de gélose après incubation appropriée mais avant l'étape suivante de la méthode (c'est-à-dire que le bouillon estensemencé sur gélose sélective, incubé dans les conditions appropriées, puis réfrigéré pour 24 à 72 heures avant de prélever les colonies présumées); 3. la réfrigération des bouillonsensemencés (ou des aliquotes de ceux-ci) pendant que l'ensemencement et la confirmation est complétée ainsi que la réfrigération des géloses sélectives pendant que l'on effectue la confirmation. Il faut utiliser des contrôles appropriés tout au long de ces modifications.

Note : Il incombe au laboratoire de valider pleinement toutes déviations par rapport aux méthodes à l'aide d'études et de contrôles appropriés.

Réincubation des boîtes de gélose

Il arrive fréquemment que l'on procède à une réincubation des boîtes de gélose (malgré les directives figurant dans la méthode) afin de permettre aux colonies d'atteindre une dimension suffisante pour effectuer les numérations ou les prélèvements. Il est reconnu que certains sérotypes du micro-organisme ciblé sont parfois considérés comme "à croissance lente"; une période d'incubation supplémentaire pourrait donc être nécessaire. Il est également courant de réincuber les plaques de gélose négatives, afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas de micro-organismes "à croissance lente", avant de diffuser les résultats. Des contrôles appropriés doivent être effectués tout au long de ces modifications.

Utilisation des conseils utiles tirés des feuilles d'instruction des trousse, mais qui ne sont pas dans la méthode du Compendium

À moins que cela ne soit précisé dans la méthode, les conseils utiles fournis par les fabricants, soit dans les trousse ou dans la correspondance, peuvent être utilisés dans la méthode.

Réanalyse d'un échantillon

Si l'analyse initiale d'un échantillon ne peut être terminée, on peut envisager de réanalyser à la

demande de l'inspecteur ou du client.

Une nouvelle unité analytique peut être obtenue à partir de l'échantillon d'origine, si celui-ci a été maintenu dans des conditions appropriées qui ont permis de prévenir toute modification à son état original.

Épreuves de confirmation

Réincubation des tests biochimiques

Il est acceptable de réincuber les épreuves biochimiques (par exemple les glucides dans les géloses, les bouillons ou dans les trousse d'identification rapide) lorsque la réaction de coloration n'est pas définitive. Cela peut se produire lorsque l'isolat a une croissance lente et qu'il faut davantage de temps pour qu'il atteigne une quantité suffisante de manière à obtenir une réaction définitive. L'analyste peut réincuber pendant une période pouvant atteindre 24 h de plus, mais il doit réexaminer l'épreuve toutes les quelques heures jusqu'à ce que la réaction soit adéquate. L'analyste devrait également vérifier auprès du fabricant de la trousse ou de l'essai si des problèmes surviennent.

Consigner les résultats

Il est possible que divers clients disposent de leurs propres spécifications microbiologiques pour les matières premières, les échantillons environnementaux ou les produits intermédiaires/finis, qui complètent et augmentent les spécifications établies par le gouvernement du Canada. Les exemples fournis dans la section « Consigner les résultats » reflètent les règlements, les normes et les lignes directrices énoncés dans la *Loi sur les aliments et drogues* et le règlement afférent de même que dans d'autres politiques gouvernementales. Il est reconnu que l'analyste peut consigner et rapporter les résultats de l'analyse de manière à tenir compte des besoins du client; et que ceci peut être déterminé par toute modification de la limite de détection et l'utilisation de dilutions alternatives, tel que décrit ci-dessus.