BD Middlebrook 7H10 Agar

APPLICATION
La **BD Middlebrook 7H10 Agar** (gélose Middlebrook 7H10) est utilisée pour l'isolement et la culture des mycobactéries.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE
Méthode microbiologique.
Au cours de ce siècle, de nombreux milieux de culture ont été développés dans le but de cultiver des mycobactéries. Les plus anciens étaient des formulations à base d'œuf comportant un milieu de Löwenstein-Jensen et un milieu de Petragnani. Dubos et Middlebrook ont joué un rôle déterminant dans l'élaboration d'un certain nombre de formulations contenant de l'acide oléique et de l'albumine en tant que principaux ingrédients destinés à favoriser la croissance du bacille de la tuberculose et à protéger les microorganismes contre divers agents toxiques.[1] Par la suite, Middlebrook et Cohn ont amélioré la formulation de la gélose acide oléique-albumine et ont obtenu une croissance plus rapide et plus abondante de *Mycobacterium* spp. sur leur milieu, désigné sous l'appellation 7H10.[2,3] Il a été rapporté que dernier a moins tendance à favoriser la croissance des contaminants que les milieux à base d'œuf couramment utilisés pour la culture des mycobactéries.[4]
Dans la **BD Middlebrook 7H10 Agar**, divers sels inorganiques apportent les substances essentielles à la croissance des mycobactéries. Le citrate de sodium, lorsqu'il est converti en acide citrique, assure la rétention de certains cations inorganiques dans la solution. Le glycérol est une abondante source de carbone et d'énergie. L'acide oléique, ainsi que d'autres acides gras à longue chaîne, peuvent être utilisés par le bacille de la tuberculose et jouent un rôle important dans le métabolisme des mycobactéries. La catalase détruit les peroxydes toxiques pouvant être présents dans le milieu. L'albumine ayant pour principal effet de protéger le bacille de la tuberculose contre les agents toxiques, elle facilite la mise en évidence de ce bacille lors de l'isolement primaire. L'inhibition partielle des bactéries contaminantes est assurée par la présence du colorant vert malachite.

REACTIFS
BD Middlebrook 7H10 Agar
Formule* par litre d'eau purifiée

Sulfate de magnésium	0,025 g	Albumine bovine V	5,0 g
Citrate d'ammonium ferrique	0,04	Catalase	0,004
Citrate de sodium	0,4	Pyridoxine	0,001
Sulfate d'ammonium	0,5	Sulfate de zinc	0,001
Glutamate monosodique	0,5	Sulfate de cuivre	0,001
Phosphate disodique	1,5	Biotine	0,0005
Phosphate monopotassique	1,5	Chlorure de calcium	0,0005
Gélose	17,0	Vert malachite	0,00025
Chlorure de sodium	0,85	Glycérol	5,0
Glucose	2,0	Acide oléique	0,05 mL

pH 6,6 ± 0,2
*Ajustée et/ou complémentée en fonction des critères de performances imposés.

PRECAUTIONS
IVD . A usage professionnel uniquement.
Ne pas utiliser de boîte de Pétri présentant des signes de contamination microbienne, décoloration, dessiccation ou fissure, ou d'autres signes de détérioration.

Consulter le document **MODE D'EMPLOI GENERAL** pour plus d'informations concernant les procédures de manipulation aseptique, les risques biologiques et l'élimination des produits usagés.
Les méthodes de laboratoire impliquant des mycobactéries nécessitent un équipement et des techniques particulières afin de minimiser les risques biologiques.[5-7] Les échantillons et les cultures doivent être manipulés conformément aux méthodes de sécurité biologique de niveau 3.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les boîtes de Pétri dans l'obscurité entre 2 et 8 °C, dans leur emballage d'origine, jusqu'au moment de leur utilisation. Ne pas congeler ni surchauffer. Les boîtes peuvent être ensemencées jusqu'à leur date de péremption (voir étiquette sur l'emballage) et incubées pendant le délai d'incubation recommandé.
Des boîtes provenant d'une pile ouverte de 10 boîtes sont utilisables pour une semaine lorsqu'elles sont conservées entre +2 et +8 °C dans un endroit propre.

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Ensemencer des échantillons représentatifs avec les souches suivantes (pour plus de détails, voir le document **MODE D'EMPLOI GENERAL**). Incuber à 35 ± 2 °C en conditions aérobies, ou en atmosphère aérobie complémentée en dioxyde de carbone.

Souche	**Incubation**	**Résultat**
Mycobacterium tuberculosis H37Ra ATCC 25177	2 à 3 semaines	Croissance bonne à importante
Mycobacterium fortuitum DSM 46621	2 à 3 semaines	Croissance bonne à importante
Mycobacterium smegmatis DSM 43061	2 à 5 jours	Croissance bonne à importante
Mycobacterium terrae ATCC 15755	2 à 3 semaines	Croissance moyenne à importante
Staphylococcus aureus ATCC 25923	2 à 5 jours	Inhibée
Escherichia coli ATCC 25922	2 à 5 jours	Inhibée
Sans ensemencement	Ambre avec une très légère teinte verdâtre	

METHODE

Matériaux fournis

BD Middlebrook 7H10 Agar (boîtes de Pétri **Stacker** de 90 mm). Produits contrôlés microbiologiquement.

Matériaux non fournis

Milieux de culture auxiliaires, réactifs et matériel de laboratoire requis.

Types d'échantillons

Ce milieu est utilisé pour l'isolement et la culture de mycobactéries à partir d'échantillons cliniques, et peut également être employé pour la culture de mycobactéries dans des tests spéciaux (p. ex. pour tester des désinfectants par rapport à des mycobactéries).
Pour plus d'informations sur les échantillons appropriés, consulter les documents cités en référence.[6-10]

Mode opératoire du test

Le mode opératoire du test est celui recommandé par les centres épidémiologiques (CDC) aux Etats-Unis pour réaliser un isolement primaire à partir d'échantillons contenant des mycobactéries. L'utilisation d'une solution de N-acétyl-L-cystéine-hydroxyde de sodium (NALC-NaOH) est recommandée pour servir d'agent de digestion et de décontamination à la fois non agressif et efficace. Pour plus d'informations sur les méthodes de décontamination et de culture, consulter les documents cités en référence.[4-10]
Après l'ensemencement, conserver les boîtes de Pétri à l'abri de la lumière et les placer, milieu vers le bas, dans un récipient **BD GasPak** fonctionnant avec une enveloppe jetable **GasPak** génératrice de dioxyde de carbone, ou dans tout autre système approprié fournissant une

atmosphère aérobie complémentée en dioxyde de carbone. Incuber à 35 ± 2 °C. Eviter tout dessèchement du milieu lors de l'incubation.
Remarque : Les cultures provenant de lésions cutanées ou de lésions du tissu mou susceptibles de contenir *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum, M. chelonae* ou toute autre espèce dont la croissance requiert une température inférieure doivent être incubées entre 25 et 33 °C. Incuber une culture identique entre 35 et 37 °C.[5,9]

Résultats
Les boîtes peuvent être examinées dans les 5 à 7 jours suivant l'ensemencement, et ensuite une fois par semaine pendant 8 semaines au maximum. Pour plus d'informations sur la morphologie et la pigmentation des colonies, consulter les documents cités en référence.[6-10]
Pour examiner les boîtes, les retourner sur la platine d'un microscope à dissection. Examiner en lumière transmise avec un grossissement de 10-60x. Utiliser un grossissement de 10-20x pour rechercher rapidement la présence éventuelle de colonies. Un grossissement supérieur (30-60x) permet d'observer la morphologie des colonies, et donc de détecter les colonies de forme sinueuse.
Enregistrer les observations suivantes : [5,6]

1. Nombre de jours nécessaire aux colonies pour être visibles à l'œil nu.
2. Nombre de colonies :
   Aucune colonie = Négatif
   Moins de 50 colonies = Consigner leur nombre effectif
   50 à 100 colonies = 1+
   100 à 200 colonies = 2+
   Colonies presque agglomérées (200 à 500) = 3+
   Colonies agglomérées (plus de 500) = 4+
3. Production pigmentaire
   Blanc, crème ou chamois = Non chromogène (NC)
   Citron, jaune, orange, rouge = Chromogène (Ch)

Des frottis colorés mettent en évidence les bacilles acido-résistants, qui sont simplement consignés en tant que « bacilles acido-résistants », sauf si des tests définitifs sont réalisés. Consulter les publications citées en référence plus d'informations sur les autres tests de différenciation et sur les méthodes d'identification complète des microorganismes isolés.[4-10]

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

La **BD Middlebrook 7H10 Agar** est l'un des milieux à base de gélose standard utilisés pour isoler et cultiver des mycobactéries à partir d'échantillons cliniques.[4,6,7-11]
Ce milieu n'étant que partiellement sélectif, des bactéries autres que des mycobactéries peuvent s'y développer si les échantillons ne font pas l'objet, au préalable, d'un traitement de décontamination approprié.[6,7,9,10]

Les cultures négatives n'éliminent pas la possibilité d'une infection active par des mycobactéries. Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent d'ensemencer plusieurs formulations de milieux (solides et liquides).[6-10]

REFERENCES

1. Dubos, R.J., and G. Middlebrook. 1947. Media for tubercle bacilli. Am. Rev. Tuberc. 56:334-345.
2. Middlebrook, G., and M.L. Cohn. 1958. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. Am. J. Pub. Health. 48:844-853.
3. Middlebrook, G., M.L. Cohn, W.E. Dye, W.B. Russell, Jr., and D. Levy. 1960. Microbiologic procedures of value in tuberculosis. Acta Tuberc. Scand. 38:66-81.
4. Kubica, G.P., and W.E. Dye. 1967. Laboratory methods for clinical and public health mycobacteriology. PHS Publication No. 1547. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
5. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.

6. Sommers, H.M., and J.K. McClatchy. 1983. Cumitech 16, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., J.A. Morello. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Küchler, R., et al. 1998. Tuberkulose - Mycobacteriose. *In:* Mauch, H., R. Lüttiken, and S. Gatermann (ed.). MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, vol. 5. Urban & Fischer, Munich, Germany.
8. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
9. Pfyffer, G.E., B.A. Brown-Elliott, and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: general charcteristics, isolation, and staining procedures. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. DIN 58943. 1996. Diagnosis of tuberculosis. Part 3: Detection of mycobacteria by culture methods. Beuth Verlag, Berlin.
11. Vincent, V., B.A. Brown-Elliott, K.C. Jost, Jr., and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: phenotypic and genotypic identification. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

CONDITIONNEMENT

BD Middlebrook 7H10 Agar

N° réf. 254520	Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 20 unités par carton
N° réf. 254521	Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 120 unités par carton

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Pour plus d'informations, contacter le représentant local de BD.

Becton Dickinson GmbH
Tullastrasse 8 – 12
D-69126 Heidelberg/Germany
Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16
Reception_Germany@europe.bd.com

http://www.bd.com
http://www.bd.com/europe/regulatory/

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo and all other trademarks are the property of Becton, Dickinson and Company. © 2012 BD