



PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE (Facultatif)

I INTRODUCTION

Le Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol est un milieu de culture non sélectif des mycobactéries.

II MODE OPERATOIRE DU TEST

A. Préparation des inoculums

1. A l'aide d'écouvillons stériles, ensemercer des géloses inclinées Lowenstein-Jensen avec des cultures mères des souches de mycobactéries concernées.
2. Incuber les tubes, avec les bouchons desserrés, à  $35 \pm 2$  °C, en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone (5-10%), jusqu'à obtention d'une croissance bactérienne importante (habituellement en 2 à 3 semaines).
3. Récolter les colonies à l'aide d'un écouvillon à bout vif en veillant à ne pas emporter de milieu de culture avec les cellules.

a. *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 :

- (1) Transférer les colonies dans 5,0 mL de Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol dans un tube de verre à bouchon à vis stérile contenant des billes de verre stériles.
- (2) Homogénéiser la suspension à l'agitateur à vortex (pendant plusieurs minutes) jusqu'à disparition des agrégats de grande taille.
- (3) Comparer la turbidité de cette suspension à celle d'un standard de turbidité néphélométrique McFarland n° 1. La suspension obtenue doit présenter une turbidité supérieure à celle du standard.
- (4) Laisser reposer le tube dans un portoir pendant 2 à 3 h à température ambiante pour faire sédimenter les particules de grande taille.
- (5) Transférer le surnageant dans un récipient stérile.
- (6) Ajouter lentement du Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol stérile pour ajuster la turbidité de la suspension à celle du standard McFarland n° 1 ( $10^8$  UFC/mL). Bien agiter.
- (7) Diluer à  $10^5$  UFC/mL avant l'emploi. Bien mélanger et ensemercer le milieu de test à l'aide d'un ensemeur à anse calibrée de 0,01 mL.

b. Autres souches de mycobactéries :

- (1) Transférer les colonies prélevées dans un tube à centrifuger à bouchon à vis de 50 mL contenant 8 à 12 billes de verre stériles (2 mm de diamètre) et 5 mL de diluant Mycobacterium Diluent préparé comme suit :
  - Mélanger les ingrédients suivants dans une fiole de 1 L et ajuster le pH à 6,7 à 7,0 avec de la soude 1 N
    - Albumine bovine sans acide gras 1,0 g
    - Polysorbate 80 0,1 mL
    - Eau purifiée 500 mL
  - Stériliser par filtration sur membrane (porosité de 0,2 µ)
  - Distribuer en conditions aseptiques 5,5 mL de solution dans des tubes à centrifuger, à bouchon à vis stériles.
- (2) Emulsifier les colonies de mycobactéries sur la paroi d'un tube à centrifuger à bouchon à vis à l'aide d'un écouvillon. Mélanger les colonies avec le diluant.
- (3) Boucher le tube et mélanger à l'agitateur à vortex pendant environ 10 min jusqu'à disparition des agrégats de grande taille dans la suspension.
- (4) Ajouter 15 mL de Mycobacterium Diluent stérile et bien mélanger.
- (5) Comparer la turbidité de cette suspension à celle d'un standard de turbidité McFarland n° 1. La suspension obtenue doit présenter une turbidité supérieure à celle du standard.
- (6) Laisser reposer le tube dans un portoir pendant 2 à 3 h à température ambiante pour faire sédimenter les particules de grande taille.
- (7) Aspirer le surnageant et le transférer dans un récipient stérile. La suspension obtenue doit présenter une turbidité supérieure à celle du standard McFarland

n° 1, sans particules de grande taille. S'il reste de telles particules, mélanger et laisser reposer pendant encore 1 h. Transférer le surnageant dans un récipient stérile.

- (8) Ajouter lentement du Mycobacterium Diluent stérile pour ajuster la turbidité de la suspension à celle du standard McFarland n° 1 (10<sup>8</sup> UFC/mL). Bien agiter.
- (9) Aliquoter la suspension dans des flacons supportant la congélation. Reporter l'identité du microorganisme et la date de préparation sur l'étiquette.
- (10) Congeler les flacons à -60 °C. Les suspensions se conservent jusqu'à 6 mois.
- (11) Pour décongeler la suspension, placer le flacon congelé au bain-marie à une température comprise entre 30 et 35 °C. Diluer à 10<sup>5</sup> UFC/mL avant l'emploi. Bien mélanger et ensemercer le milieu de test à l'aide d'un ensemenceur à anse calibrée de 0,01 mL.

#### B. Méthode de test du milieu

1. Ensemercer des échantillons représentatifs avec les cultures répertoriées ci-dessous.
  - a. A l'aide d'ensemenceurs à anse calibrée de 0,01 mL stériles jetables, ensemercer les tubes avec les cultures préparées comme ci-dessus.
  - b. Incuber les tubes, avec les bouchons desserrés, à 35 ± 2 °C, en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone.
2. Examiner les tubes après 7, 14 et, le cas échéant, 21 jours pour déceler une éventuelle croissance ou l'apparition d'une pigmentation.
3. Résultats attendus

##### Souches de contrôle CLSI

\**Mycobacterium tuberculosis*..... Croissance  
H37Ra ATCC 25177

\**Mycobacterium kansasii* ..... Croissance  
Groupe I ATCC 12478

\**Mycobacterium scrofulaceum*..... Croissance  
Groupe II ATCC 19981

\**Mycobacterium intracellulare*..... Croissance  
Groupe III ATCC 13950

\**Mycobacterium fortuitum* ..... Croissance  
Groupe IV ATCC 6841

\*Souche de microorganisme recommandée pour le contrôle de qualité par l'utilisateur.

#### III CONTROLE DE QUALITE SUPPLEMENTAIRE

1. Examiner les tubes comme décrit à la rubrique « Détérioration du produit ».
2. Inspecter visuellement des tubes représentatifs pour s'assurer qu'aucun défaut physique ne peut interférer avec leur utilisation.
3. Incuber des tubes représentatifs non ensemenés en conditions aérobies entre 20 et 25 °C et 30 et 35 °C, et les examiner après 7 jours pour déceler une contamination microbienne éventuelle.

### INFORMATIONS PRODUIT

#### IV APPLICATION

Le Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol est un milieu complété qui permet de cultiver des mycobactéries, y compris *M. tuberculosis*. Il sert principalement à cultiver des cultures pures de mycobactéries à usage de laboratoire.

#### V RESUME ET EXPLICATION

Middlebrook et al. ont mis au point la formulation de la base de bouillon 7H9 en même temps que celle de la base de gélose 7H10.<sup>1-3</sup> Ces deux types de milieu permettent la croissance des espèces de mycobactéries lorsqu'ils sont complétés de nutriments comme le glycérol, l'acide oléique, l'albumine et le dextrose, à l'exception de *M. bovis*, dont la croissance est inhibée par le glycérol.

Ce milieu sert à la préparation des inoculums pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens et s'utilise comme milieu de base pour réaliser des tests biochimiques et repiquer des souches mères.

## VI PRINCIPES DE LA METHODE

La grande variété de sels inorganiques présents dans ce milieu apporte les électrolytes indispensables à la croissance des mycobactéries. Converti en acide citrique, le citrate de sodium sert à maintenir certains cations inorganiques en solution. Le chlorure de sodium, l'albumine bovine, le dextrose et la catalase sont des composants du supplément Middlebrook ADC. L'albumine sert d'agent protecteur en liant les acides gras libres qui peuvent être toxiques pour *Mycobacterium* sp. La catalase détruit les peroxydes toxiques qui peuvent être présents dans le milieu. Le dextrose est une source d'énergie. Le chlorure de sodium apporte les électrolytes essentiels. Le supplément de glycérol favorise la croissance des mycobactéries.

## VII REACTIFS

### Middlebrook 7H9 Broth

Formule approximative\* par litre d'eau purifiée

Phosphate monopotassique .....	2,0	g
Phosphate disodique .....	1,5	g
Glutamate monosodique .....	0,5	g
Citrate de sodium .....	0,1	g
Sulfate d'ammonium .....	0,5	g
Pyridoxine .....	0,001	g
Citrate d'ammonium ferrique .....	0,04	g
Sulfate de magnésium .....	0,05	g
Sulfate de zinc .....	0,001	g
Sulfate de cuivre .....	0,001	g
Biotine .....	0,5	mg
Chlorure de calcium .....	0,5	mg

\*Ajustée et/ou complétée en fonction des critères de performances imposés.

En plus des ingrédients répertoriés ci-dessous, le milieu complet préparé en tubes contient (par litre) 2 mL de glycérol et les composants du supplément ADC, c'est-à-dire :

Chlorure de sodium .....	0,85	g
Albumine bovine (fraction V) .....	5,0	g
Dextrose .....	2,0	g
Catalase .....	4,0	mg
Pyruvate de sodium .....	1,0	g

### Avertissements et précautions

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Ouvrir avec précaution les tubes étroitement bouchés pour ne pas risquer d'être blessé par un bris de verre.

Les manipulations non susceptibles de produire des aérosols d'échantillons cliniques, comme la préparation de frottis acido-résistants, nécessitent des pratiques et des méthodes de sécurité biologique de niveau 2, ainsi que les installations et le matériel de confinement correspondants. Toutes les manipulations susceptibles de produire des aérosols doivent être effectuées sous hotte biologique de sécurité de classe I ou II. Les activités de laboratoire impliquant la propagation et la manipulation de cultures de *M. tuberculosis* et *M. bovis* nécessitent des pratiques de sécurité biologique de niveau 3, ainsi que les installations et le matériel de confinement correspondants. Les études chez l'animal nécessitent également des procédures particulières.<sup>4</sup>

Respecter les techniques d'asepsie et prendre les précautions en vigueur contre les dangers microbiologiques. Après utilisation, stériliser à l'autoclave les tubes préparés, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé avant de les éliminer.

### Instructions pour la conservation

Dès réception, conserver les tubes dans l'obscurité, à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Ne pas ouvrir prématurément. Les maintenir à l'abri de la lumière. Conservés comme indiqué sur l'étiquette, les milieux en tube peuvent être ensemencés jusqu'à la date de péremption et incubés pendant les durées d'incubation recommandées (jusqu'à 8 semaines pour les milieux de mycobactériologie). Laisser le milieu s'équilibrer à température ambiante avant de l'ensemencer.

### **Détérioration du produit**

Ne pas utiliser les tubes s'ils présentent des signes de contamination microbienne, décoloration ou dessiccation, ou d'autres signes de détérioration.

## **VIII PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS**

Les échantillons adaptés à la culture peuvent être préparés selon différentes techniques. Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.<sup>5,6</sup> Prélever les échantillons avant l'administration d'agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

## **IX METHODE**

### **Matériaux fournis**

Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

### **Matériaux requis mais non fournis**

Milieux de culture auxiliaires, réactifs, souches de contrôle de qualité et matériel de laboratoire requis.

### **Mode opératoire du test**

Respecter les techniques d'asepsie.

Incuber les tubes ensemencés en atmosphère aérobie, enrichie de 5 à 10 % de dioxyde de carbone. Incuber à  $35 \pm 2$  °C pendant 8 semaines. Incuber les tubes avec les bouchons desserrés pendant les 3 premières semaines pour permettre une circulation du dioxyde de carbone et la mise en route de la culture. Visser ensuite les bouchons pour éviter la déshydratation ; les desserrer brièvement une fois par semaine.

### **Contrôle de qualité par l'utilisateur**

Voir « Procédures de contrôle de qualité ».

Chaque lot de milieu a été testé à l'aide des organismes de contrôle de qualité adaptés et ces tests sont conformes aux spécifications du produit, ainsi qu'aux normes CLSI, lorsqu'elles sont applicables. Comme toujours, les tests de CQ doivent être réalisés conformément aux réglementations locales, régionales, nationales ou internationales, aux exigences d'accréditation et/ou aux protocoles de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement.

## **X RESULTATS**

Examiner les cultures dans les 5 à 7 jours suivant l'ensemencement, puis une fois par semaine jusqu'à 8 semaines. La culture de mycobactéries en tubes de bouillon peut servir à réaliser des analyses de laboratoires complémentaires.

## **XI LIMITES DE LA PROCEDURE**

Pour procéder à l'identification, les microorganismes doivent se trouver en culture pure. L'identification définitive nécessite des tests morphologiques, biochimiques et/ou sérologiques. Consulter les publications citées en référence pour plus d'informations sur les méthodes recommandées.<sup>5-7</sup>

## **XII CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES**

Les caractéristiques de performances de tous les lots de Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol sont testées en usine. A l'aide d'un ensemencement à anse calibrée de 0,01 mL, des échantillons représentatifs du lot sont ensemencés avec des cultures de *Mycobacterium kansasii* Groupe I (ATCC 12478), *M. scrofulaceum* Groupe II (ATCC 19981), *M. intracellulare* Groupe III (ATCC 13950), *M. fortuitum* Groupe IV (ATCC 6841) et *M. tuberculosis* (ATCC 25177) diluées à  $10^3$  unités formant colonies (UFC) par 0,01 mL. Les tubes ensemencés sont incubés, bouchons desserrés, à  $35 \pm 2$  °C, en atmosphère enrichie de 5 à 10 % de dioxyde de carbone. Les tubes sont examinés après 7, 14 et 21 jours d'incubation pour déceler une éventuelle croissance. Toutes les cultures présentent une croissance modérée à importante dans les 21 jours.

### XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
221832	BD BBL Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol, 5 mL

### XIV REFERENCES

1. Middlebrook, G. 1955. Fitzsimmons Army Hospital Report No. 1, Denver.
2. Middlebrook, G., and M.L. Cohn. 1958. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *Am. J. Public Health.* 48:844-853.
3. Middlebrook, G., M.L. Cohn, and W.B. Schaefer. 1954. Studies on isoniazid and tubercle bacilli. III. The isolation, drug-susceptibility and catalase-testing of tubercle bacilli from isoniazid-treated patients. *Am. Rev. Tuberc.* 70:852-872.
4. U.S. Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 4th ed. HHS Publication No. (CDC) 93-8395. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
5. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.). 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
7. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Service et assistance technique de BD Diagnostics : contacter votre représentant local de BD ou consulter le site [www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds).



Becton, Dickinson and Company  
7 Loveton Circle  
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited  
Pottery Road, Dun Laoghaire  
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.  
BD, BD Logo, and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD