

**PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE****I INTRODUCTION**

La Middlebrook and Cohn 7H10 Agar est un milieu servant à la culture des mycobactéries.

**II MODE OPERATOIRE DU TEST****A. Methode de preparation de l'inoculum**

1. Ensemencer des géloses inclinées Lowenstein-Jensen avec des cultures de souches de mycobactéries appropriées, à l'aide de bâtonnets d'ensemencement stériles.
2. Incuber les tubes, bouchons desserrés, en atmosphère aérobie, à une température de  $35 \pm 2$  °C complétement au dioxyde de carbone, jusqu'à ce qu'une forte croissance soit atteinte (généralement au bout de deux ou trois semaines).
3. A l'aide d'un bâtonnet applicateur bien taillé et stérile, récolter la croissance en retirant doucement les cellules de la surface du milieu, en prenant soin de ne pas incorporer de milieu à la récolte.
  - a. Pour *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 :
    - (1) Transférer la croissance dans 5,0 mL de bouillon Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol et introduire le tout dans un tube en verre stérile à bouchon à vis contenant des billes de verre stériles.
    - (2) Vortexer (plusieurs minutes) jusqu'à ce que la suspension soit exempte de gros amas.
    - (3) Comparer cette suspension à un standard du néphélomètre McFarland n°1. La suspension doit être plus trouble que le standard.
    - (4) Placer le tube dans un portoir pendant 2 à 3 h à température ambiante pour permettre aux grosses particules de se déposer au fond.
    - (5) Transférer le surnageant dans un récipient stérile.
    - (6) Ajuster la turbidité de la suspension jusqu'au standard McFarland n° 1 en ajoutant lentement du bouillon Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol. Bien agiter.
    - (7) Diluer à  $10^5$  UFC/mL avant utilisation. Bien mélanger et ensemencer en stries le milieu de test à l'aide d'une anse calibrée (0,01 mL).
  - b. Pour toutes les autres souches de mycobactéries :
    - (1) Transférer la croissance dans un tube de centrifugation de 50 mL à bouchon à vis contenant 8 à 12 billes de verre stériles (2 mm de diamètre) et 5 mL de Mycobacterium Diluent préparé comme suit :
      - Mélanger les ingrédients suivants dans un flacon d'1 L et ajuster le pH avec de l'hydroxyde de sodium 1N, jusqu'à 6,7 à 7,0.

Albumine bovine (sans acide gras).....	1,0 g
Polysorbate 80 .....	0,1 mL
Eau purifiée.....	500 mL
      - Stériliser par filtration sur membrane (filtre de 0,2 µ)
      - Distribuer en conditions aseptiques des volumes de 5,5 mL dans des tubes stériles à bouchon à vis.
    - (2) Emulsifier la colonie de mycobactéries sur la paroi latérale d'un tube de centrifugation à bouchon à vis à l'aide d'un bâtonnet applicateur. Mélanger la croissance avec le diluant.
    - (3) Boucher le tube et vortexer pendant 10 min environ jusqu'à ce que la croissance soit bien en suspension et exempte de gros amas.
    - (4) Ajouter 15 mL de Mycobacterium Diluent stérile et bien mélanger.
    - (5) Comparer cette suspension à un standard du néphélomètre McFarland n° 1. La suspension doit être plus trouble que le standard.
    - (6) Placer le tube dans un portoir pendant 2 à 3 h à température ambiante pour permettre aux grosses particules de se déposer au fond.
    - (7) Aspirer le surnageant et le transférer dans un récipient stérile. La suspension doit être plus trouble qu'un standard McFarland n° 1 et exempte de grosses particules. Si de telles particules sont encore présentes, mélanger et attendre 1 h supplémentaire. Transférer le surnageant dans un récipient stérile.
    - (8) Ajuster la turbidité de la suspension au standard McFarland n° 1 en ajoutant lentement du Mycobacterium Diluent stérile. Bien agiter.
    - (9) Verser les aliquotes de la suspension dans des flacons de congélation étiquetés. L'étiquette doit indiquer l'organisme contenu et la date de préparation.
    - (10) Congeler les suspensions en disposant les flacons dans un congélateur basse température à -60 °C. Ces derniers peuvent être conservés pendant six mois.
    - (11) Pour décongeler la suspension, placer le flacon congelé au bain-marie entre 30 et 35 °C. Diluer à  $10^5$  UFC/mL avant l'emploi. Bien mélanger et ensemencer en stries le milieu de test à l'aide d'un ensementeur à anse calibrée de 0,01 mL.

## B. Méthode d'analyse du milieu

1. Ensemencer des échantillons représentatifs avec les cultures répertoriées ci-dessous.
  - a. Vérifier que les surfaces de la gélose sont exemptes d'humidité avant l'ensemencement.
  - b. A l'aide d'anses calibrées (0,01 mL) stériles jetables, ensemencer les récipients à essai avec les cultures mycobactériennes préparées comme décrit ci-dessus.
  - c. Incuber tous les récipients, bouchons desserrés, en atmosphère aérobie, à une température de  $35 \pm 2$  °C complétement au dioxyde de carbone.
  - d. Incuber également des tubes de la gélose Middlebrook 7H10 Agar précédemment testée afin qu'ils servent de contrôles.
2. Au bout de 7, 14 et, si nécessaire, 21 jours, examiner les récipients afin de contrôler la croissance, la sélectivité et la pigmentation.
3. Résultats attendus

Microorganismes	ATCC	Récupération
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Croissance
* <i>Mycobacterium kansasii</i> , groupe I	12478	Croissance
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , groupe II	19981	Croissance
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , groupe III	13950	Croissance
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , groupe IV	6841	Croissance

\*Souche recommandée pour le Contrôle de qualité réalisé par l'utilisateur.

**REMARQUE:** Doit être surveillé par l'utilisateur, conformément à CLSI M22-A3.

## III CONTROLE DE QUALITE SUPPLEMENTAIRE

1. Examiner les tubes ou les flacons comme décrit à la rubrique « Détérioration du produit ».
2. Examiner visuellement des tubes ou flacons représentatifs pour s'assurer qu'aucun défaut physique ne peut interférer avec leur utilisation.
3. Incuber les tubes ou les flacons d'échantillons non ensemencés dans une atmosphère allant de 20 à 25 °C et de 30 à 35 °C pendant 7 jours, puis examiner la contamination microbienne.

## INFORMATIONS PRODUIT

## IV APPLICATION

La Middlebrook and Cohn 7H10 Agar (gélose de Middlebrook et Cohn 7H10) est utilisée dans des procédures qualitatives d'isolement et de culture des mycobactéries.

## V RESUME ET EXPLICATION

Au fil des années, de nombreux milieux de culture ont été mis au point pour la culture des mycobactéries. Les premiers étaient des formulations à base d'œuf et comprenaient le milieu de Lowenstein-Jensen et celui de Petragnani. Dubos et Middlebrook ont joué un rôle-clé dans le développement d'un certain nombre de formulations dont l'acide oléique et l'albumine constituaient les ingrédients principaux, destinées à favoriser la croissance du bacille de la tuberculose et à protéger les microorganismes de divers agents toxiques.<sup>1</sup> Middlebrook et Cohn ont par la suite amélioré la formulation de la gélose albumine-acide oléique et ont obtenu une croissance plus rapide et plus abondante des espèces de *Mycobacterium* dans leur milieu désigné 7H10.<sup>2,3</sup> Ce milieu est réputé pour développer moins de contaminants que les milieux à base d'œuf couramment utilisés pour la culture des mycobactéries.<sup>4</sup>

## VI PRINCIPES DE LA METHODE

La gélose de Middlebrook and Cohn 7H10 contient divers sels inorganiques fournissant des substances essentielles à la croissance des mycobactéries. Le citrate de sodium, une fois converti en acide citrique, sert à conserver certains cations inorganiques dans la solution. Le glycérol est une source de carbone et d'énergie importante. L'acide oléique, comme d'autres acides gras à longue chaîne, peut être utilisé par le bacille de la tuberculose et joue un rôle important dans le métabolisme des mycobactéries. L'albumine sert en premier lieu à protéger les bacilles de la tuberculose des agents toxiques et facilite par là-même leur récupération sur isolement primaire. La catalase détruit les peroxydes toxiques éventuellement présents dans le milieu. L'inhibition partielle des bactéries est obtenue par la présence du colorant vert malachite.

## VII REACTIFS

### Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

Formule approximative\* par litre d'eau purifiée

Sulfate de magnésium .....	0,05	g
Citrate d'ammonium ferrique .....	0,04	g
Citrate de sodium .....	0,4	g
Sulfate d'ammonium .....	0,5	g
Glutamate monosodique .....	0,5	g
Phosphate disodique .....	1,5	g
Phosphate monopotassique .....	1,5	g
Gélose .....	13,5	g
Chlorure de sodium .....	0,85	g
Dextrose .....	2,0	g
Albumine bovine (fraction V) .....	5,0	g
Catalase .....	3,0	mg
Pyridoxine .....	1,0	mg
Sulfate de zinc .....	1,0	mg
Sulfate de cuivre .....	1,0	mg
Biotine .....	0,5	mg
Chlorure de calcium .....	0,5	mg
Vert malachite .....	0,25	mg
Acide oléique .....	0,06	mL
Glycérol .....	5,0	mL

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

**Avertissements et précautions :** Réservé au diagnostic *in vitro*.

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

Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine, sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les « Précautions standard »<sup>5-8</sup> et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques. Avant de les éliminer, stériliser à l'autoclave les tubes préparés, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé.

Lors des manipulations des échantillons cliniques ne générant pas d'aérosol (préparation des frottis acido-résistants, par exemple), appliquer des pratiques et procédures de sécurité biologique de niveau 2, et utiliser les appareils et installations de confinement correspondants. Toute activité génératrice d'aérosol doit être effectuée sous une hotte biologique de sécurité de classe I ou II. Les activités en laboratoire afférentes à la propagation et la manipulation des cultures de *M. tuberculosis* et de *M. bovis* nécessitent des pratiques de sécurité biologique de niveau 3, ainsi que les appareils et installations de confinement correspondants. Les études expérimentales sur l'animal requièrent également des procédures particulières.<sup>7</sup>

**Instructions pour la conservation :** Dès réception, conserver les tubes et les flacons dans l'obscurité, à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Ne pas ouvrir prématurément. Maintenir à l'abri de la lumière. Les milieux conservés conformément aux instructions jusqu'au moment de leur utilisation peuvent être ensemencés jusqu'à la date de péremption indiquée, et incubés pendant les durées recommandées. Laisser le milieu s'équilibrer à température ambiante avant de l'ensemencer.

**Détérioration du produit :** Ne pas utiliser les tubes ou les flacons 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 mise en culture peuvent être manipulés selon différentes techniques. Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.<sup>9-11</sup> Prélever les échantillons avant l'administration des agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

## IX PROCEDURE

**Matériaux fournis :** Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

**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.

Les modes opératoires de test sont ceux recommandés par les centres épidémiologiques (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) pour l'isolement primaire à partir d'échantillons contenant des mycobactéries.<sup>9</sup> Une solution de N-acétyl-L-cystéine-hydroxyde de sodium (NALC-NaOH) est l'agent recommandé pour obtenir une digestion et une décontamination non agressives mais efficaces. Ces réactifs sont fournis dans la trousse **BBL MycoPrep** Mycobacterial Specimen Digestion/Decontamination. Pour plus d'informations sur la décontamination et sur la mise en culture, consulter les publications citées en référence.<sup>9-12</sup>

Une fois l'ensemencement effectué, conserver les récipients à l'abri de la lumière et disposez-les dans un système adapté offrant une atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone. Incuber à  $35 \pm 2$  °C.

Les milieux inclinés et en flacons doivent être ensemencés à l'horizontale jusqu'à ce que l'inoculum soit absorbé. Pendant les trois premières semaines, les bouchons des tubes et des flacons ne doivent pas être totalement refermés de façon à laisser passer le dioxyde de carbone et amorcer la croissance. Par la suite, resserrer les bouchons afin d'empêcher la déshydratation, puis les desserrer légèrement une fois par semaine. En cas de problème de place, mettre les tubes en position verticale.

**REMARQUE** : Les cultures provenant de lésions cutanées présumées de type *M. marinum* ou *M. ulcerans* doivent être incubées à une température de 25 à 33 °C pour l'isolement primaire ; les cultures présumées contenir *M. avium* ou *M. xenopi* présentent une croissance maximum à une température de 40 à 42 °C.<sup>9</sup> Incuber une seconde culture identique à une température de 35 à 37 °C.

**Contrôle de qualité par l'utilisateur** : Voir « Procédures de contrôle de qualité ».

Effectuer les contrôles de qualité conformément à la réglementation nationale et/ou internationale, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives CLSI et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

## X RESULTATS

Contrôler le résultat des cultures dans les 5 à 7 jours suivant l'ensemencement, puis une fois par semaine pendant 8 semaines maximum.

Consigner les observations suivantes :<sup>9</sup>

1. Nombre de jours avant que les colonies soient visibles à l'œil nu. Les cultures à croissance rapide présentent des colonies matures au bout de 7 jours, et les cultures à croissance lente au bout d'une durée plus longue.

2. Nombre de colonies (flacons) :

Aucune colonie = Négatif

Moins de 50 colonies = Nombre réel

50 à 100 colonies = 1+

100 à 200 colonies = 2+

Colonies quasi-confluentes (200 à 500) = 3+

Colonies confluentes (plus de 500) = 4+

3. Production pigmentaire :

Blanc, crème ou chamois = Non chromogène (NC)

Citron, jaune, orange, rouge = Chromogène (Ch)

Les frottis colorés peuvent présenter des bacilles acido-résistants. Ceux-ci doivent être simplement consignés sous l'appellation « bacilles acido-résistants », sauf si des tests définitifs sont effectués.

Les flacons peuvent être examinés retournés sur la platine d'un microscope à dissection. Effectuer l'observation en utilisant un grossissement de 10 à 60x et par transparence à la lumière. Rechercher les colonies par un balayage rapide à un grossissement de 10 à 20x. Un grossissement important (30 à 60x) permet d'observer la morphologie des colonies (sinuosité, par exemple).

## XI LIMITES DE LA PROCEDURE

Pour procéder à l'identification, les organismes doivent se trouver en culture pure. Des tests morphologiques, biochimiques et/ou sérologiques doivent être effectués pour l'identification finale. Pour obtenir des informations détaillées et connaître les procédures recommandées, consulter les publications citées en référence.<sup>9-12</sup>

## XII CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Tous les lots de récipients de Middlebrook and Cohn 7H10 Agar sont soumis à des tests en usine permettant d'évaluer les caractéristiques de leurs performances. A l'aide d'une anse calibrée (0,01 mL), des échantillons représentatifs du lot sont ensemencés en stries avec des cultures diluées jusqu'à  $10^5$  UFC par mL de *Mycobacterium kansasii* Groupe I (ATCC 21478), de *M. scrofulaceum* Groupe II (ATCC 19981), de *M. intracellulare* Groupe III (ATCC 13950), de *M. fortuitum* Groupe IV (ATCC 6841) et de *M. tuberculosis* (ATCC 25177). Après l'ensemencement, les récipients sont incubés, bouchons desserrés, à une température de  $35 \pm 2$  °C dans une atmosphère complémentée au dioxyde de carbone (5 à 10 %). La croissance et la pigmentation sont contrôlées après 7, 14 et 21 jours d'incubation. Tous les organismes présentent une croissance modérée à forte au bout de 21 jours. La pigmentation des colonies est la suivante : la couleur de *M. kansasii* est entre le blanc et le jaune crème ; celle de *M. scrofulaceum* est entre le jaune moyen et l'orange ; celle de *M. tuberculosis*, de *M. intracellulare* et de *M. fortuitum* est crème.

### XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
220958	<b>BD BBL</b> Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, boîte de 10 tubes de taille A
220959	<b>BD BBL</b> Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, carton de 100 tubes de taille A
297448	<b>BD BBL</b> Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, boîte de 10 tubes de taille C
297396	<b>BD BBL</b> Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, carton de 100 tubes de taille C
297274	<b>BD BBL</b> Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, flacons 30 mL (1 oz), carton de 100

### XIV 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, and W.B. 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. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
6. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 17:53-80.
7. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
8. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). *Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.*
9. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
10. Cernoch, P.L., R.L. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Forbes, B.A., D.F. Sahn, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
12. Metchock, B.G., F.S. Nolte, and R.J. Wallace, Jr. 1999. *Mycobacterium*, p. 399-437. *In* P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenoever, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

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