

PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE

I INTRODUCTION

Le Seven H11 Agar est un milieu de culture servant à l'isolement et à la culture des mycobactéries.

II MODE OPERATOIRE DU TEST

A. Préparation des inoculums

1. A l'aide d'écouvillons stériles, ensemer des géloses inclinées Lowenstein-Jensen avec des cultures mères des souches de mycobactéries concernées.
2. Incuber les tubes, avec les bouchons desserrés, à 35 ± 2 °C, en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone, 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 bouillon 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 min) jusqu'à disparition des agrégats de grande taille.
- (3) 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.
- (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. Bien agiter.
- (7) Diluer à 10^5 UFC/mL avant l'emploi. Bien mélanger et ensemer par striage 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 micron)
 - Distribuer en conditions aseptiques 5,5 mL de solution dans des tubes à bouchon à vis stériles.
- (2) A l'aide d'un écouvillon, émulsifier les colonies de mycobactéries sur la paroi d'un tube à centrifuger à bouchon à vis. 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. 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 entre 30 et 35 °C. Diluer à 10^5 UFC/mL avant l'emploi. Bien mélanger et ensemer par striage le milieu de test à l'aide d'un ensemeur à anse calibrée de 0,01 mL.

B. Méthode de test du milieu

1. Ensemencer des échantillons représentatifs avec les cultures répertoriées ci-dessous.
 - a. A l'aide d'ensemencement à anse calibrée de 0,01 mL stériles jetables, ensemencer les tubes avec les cultures préparées comme ci-dessus.
 - b. Incuber les récipients de culture, avec les bouchons desserrés, à 35 ± 2 °C, en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone.
 - c. Inclure des tubes de gélose Middlebrook 7H10 précédemment testés comme contrôles.
2. Examiner les tubes après 7, 14 et, le cas échéant, 21 jours pour déceler une éventuelle croissance et en apprécier la sélectivité.
3. Résultats attendus

Microorganisme	ATCC	Isolement
* <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 de microorganisme recommandée pour le contrôle de qualité par l'utilisateur.

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

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 ensemencés 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

La Seven H11 Agar (gélose Seven H11) sert à la mise à l'évidence et à la culture qualitatives des mycobactéries.

V RESUME ET EXPLICATION

De nombreux milieux ont été conçus pour la culture des mycobactéries. Les premiers étaient formulés à base d'œuf, comme le milieu de Lowenstein-Jensen et le milieu de Petragani. Dubos et Middlebrook ont joué un grand rôle dans la mise au point de plusieurs formulations à base d'acide oléique et d'albumine visant à faciliter la croissance du bacille tuberculeux et protéger les microorganismes contre différents agents toxiques.¹ Par la suite, Middlebrook et Cohn ont amélioré la formulation de la gélose à base d'acide oléique et d'albumine et obtenu une croissance plus rapide et plus abondante de *Mycobacterium* sp. sur leur milieu appelé 7H10.^{2,3}

Cohn et al. ont modifié la formulation de la gélose 7H10 en y incorporant 1 g de produits de digestion pancréatique de caséine par litre afin de favoriser la croissance des souches de *Mycobacterium tuberculosis* qui présentaient une croissance faible ou nulle sur 7H10 et d'autres milieux d'isolement conventionnels.⁴ Cette formulation est appelée Seven H11 Agar.

VI PRINCIPES DE LA METHODE

La grande variété de sels inorganiques présents dans la Seven H11 Agar apporte des substances indispensables à la croissance des mycobactéries. Converti en acide citrique, le citrate de sodium sert à maintenir certains cations inorganiques en solution. Présent en abondance, le glycérol est une source de carbone et d'énergie. Les produits de digestion pancréatique de caséine sont une source abondante d'azote nécessaire à la croissance du bacille tuberculeux et apportent plusieurs autres facteurs de croissance.¹ L'acide oléique, ainsi que d'autres acides gras à longue chaîne assimilables par le bacille tuberculeux, jouent un rôle important dans le métabolisme des mycobactéries. Le rôle principal de l'albumine est de protéger le bacille tuberculeux des agents toxiques et, par conséquent, de favoriser sa mise en évidence sur les milieux d'isolement primaire. Le vert malachite inhibe partiellement la croissance des bactéries.

VII REACTIFS

Seven H11 Agar

Formule approximative* par 900 mL d'eau purifiée

Digestion pancréatique de caséine	1,0	g
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
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

En plus des ingrédients répertoriés ci-dessus, le milieu complet préparé en tubes contient (par litre) 5 mL de glycérol et les composants du supplément Middlebrook OADC Enrichment, c'est-à-dire :

Chlorure de sodium	0,85	g
Dextrose	2,0	g
Albumine bovine (fraction V)	5,0	g
Catalase	3,0	mg
Acide oléique	0,06	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 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 »⁵⁻⁸ et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques. Après utilisation, stériliser à l'autoclave les tubes préparés, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé avant de les éliminer.

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.⁷

Instructions pour la conservation : Dès réception, conserver les tubes dans l'obscurité entre 2 et 8 °C. Eviter de congeler ou de surchauffer. Ne pas les 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.⁹⁻¹² Prélever les échantillons avant l'administration d'agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

IX METHODE

Matériaux fournis : Seven H11 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.

Le mode opératoire du test est celui recommandé par le CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention) pour réaliser un isolement primaire à partir d'échantillons contenant des mycobactéries.⁹ La N-acétyl-L-cystéine-hydroxyde de sodium (NALC-NaOH) est l'agent recommandé pour obtenir une digestion et une décontamination douces mais efficaces. Ces réactifs sont fournis dans la trousse de décontamination/digestion d'échantillons mycobactériens **BBL Mycoprep**. Pour plus d'informations sur la méthode de décontamination et de culture, consulter les publications citées en référence.⁹⁻¹²

Incuber les tubes ensemencés à 35 ± 2 °C, en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone, et les maintenir à l'abri de la lumière.

Incuber les milieux en géloses inclinées sur un plan horizontal et laisser l'inoculum s'absorber. Desserrer les bouchons à vis des tubes pendant les 3 premières semaines d'incubation 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. Incuber les tubes verticalement si l'espace est limité.

REMARQUE: Si l'on suspecte la présence de *M. marinum* ou *M. ulcerans* dans des échantillons provenant de lésions cutanées, l'isolement primaire doit s'effectuer par incubation des cultures à une température comprise entre 25 et 33 °C ; dans le cas de *M. avium* ou *M. xenopi*, la température idéale de croissance est de 40 à 42 °C.⁹ Incuber un double de la culture entre 35 et 37 °C.

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

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations nationales et/ou internationales, 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

Examiner les cultures dans les 5 à 7 jours suivant l'incubation, puis une fois par semaine jusqu'à 8 semaines.

Consigner les observations⁹

1. Nombre de jours nécessaires à l'observation macroscopique des colonies. Les souches à croissance rapide présentent des colonies matures dans les 7 jours. Il faut plus de temps aux souches à croissance lente pour former des colonies matures.
2. Production de pigment
Blanc, crème ou chamois = non chromogène (NC)
Citron, jaune, orange, rouge = chromogène (Ch)
Les frottis colorés peuvent présenter des bacilles acido-résistants, rapportés uniquement comme « bacilles acido-résistants » à moins de réaliser des tests d'identification définitive.

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.¹⁰⁻¹²

XII CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Cohn et al. ont réalisé une étude comparative de Seven H11 Agar et 7H10 Agar. Sur 96 isolats cliniques de *M. tuberculosis* testés, 13 ne se sont pas développés sur le milieu 7H10 au cours des 3 premières semaines. Dix de ces treize cultures se sont développées sur le milieu Seven H11 au cours des 3 premières semaines ; il a fallu 3 semaines d'incubation supplémentaire pour déceler une croissance pour les trois autres cultures.⁴

XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
221391	BD BBL Seven H11 Agar Slants, coffret de 10 tubes de tailles A
221392	BD BBL Seven H11 Agar Slants, carton de 100 tubes de tailles A
296105	BD BBL Seven H11 Agar Slants, coffret de 10 tubes de tailles C
297704	BD BBL Seven H11 Agar Slants, carton de 100 tubes de tailles C

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. Public 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. Cohn, M.L., R.F. Waggoner, and J.K. McClatchy. 1968. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.* 98:295-296.
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.K. 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. Tenover, 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.



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