

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 1/22
----------------------	--	---------------------	--------

Indice de révision	Nature de la modification
A	Création

## SOMMAIRE

I - Objet .....	2
II - Réactifs .....	2
III - Méthodologie.....	2
IV - Annexes .....	15

Rédigé par: Date: Signature	Vérifié par: Date: Signature	Approuvé par: Pour application le Signature
-----------------------------------	------------------------------------	---

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 2/22
----------------------	--	---------------------	--------

## I - Objet

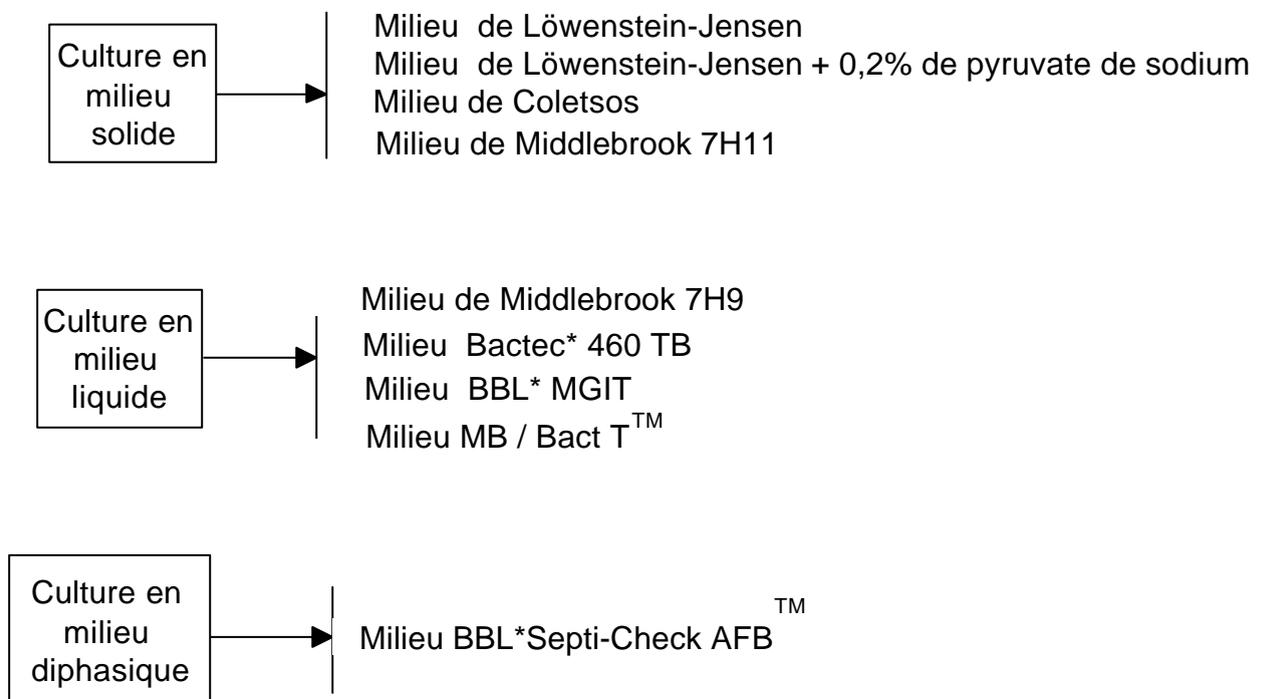
Ce document a pour objet de détailler les modalités de la mise en culture des mycobactéries et l'interprétation des résultats de la culture.

## II - Réactifs

Les modalités de la préparation des milieux de culture et des réactifs pour chacune des méthodes décrites se trouvent en annexe du document.

## III - Méthodologie

Trois modalités de culture des mycobactéries peuvent être utilisés.



Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 3/22
----------------------	--	---------------------	--------

## A - Culture en milieu solide

### 1 - Ensemencement classique

Selon la nomenclature, l'ensemencement doit être fait au moins sur 4 tubes. En pratique, on utilisera 2 tubes de milieux de Löwenstein-Jensen et 2 tubes de milieu enrichi : 1 tube de milieu Coletsos et 1 tube de milieu de Löwenstein-Jensen enrichi avec 0,2% de pyruvate.

Inoculer 0,2 ml de culot de prélèvement par tube.

Incuber les tubes non vissés, en position inclinée à 37°C. Surveiller régulièrement l'évaporation de liquide (3-6 jours) avant de revisser les tubes.

### 2 - Observation des cultures

La lecture est faite 1 fois par semaine. Eliminer les tubes contaminés et noter la nature des contaminants.

Si tous les tubes sont contaminés, refaire si possible une deuxième décontamination soit à partir du prélèvement initial, soit à partir du du culot. Sinon demander un nouveau prélèvement.

Garder les tubes de culture au moins 8 semaines à l'étuve à 37°C avant de considérer la culture comme négative.

Réaliser l'identification des cultures positives (MO-MYC-005).

### 3 - Conditions particulières de culture

Ensemencer des tubes de Löwenstein-Jensen complémentaires :

- **A différentes températures d'incubation:**

- à 30°C pour les lésions cutanées (*M. marinum*, *M. ulcerans*)

- à 42°C en cas de suspicion d'infection à *M. xenopi*

- **Enrichis pour les mycobactéries de croissance difficile**

- Milieu de Löwenstein-Jensen enrichi avec du citrate de fer ammoniacal ou milieu au sang cuit + polyvitex pour *M. haemophilum* incubé en atmosphère de CO<sub>2</sub> à 30-32°C.

- Milieu de Löwenstein-Jensen enrichi en mycobactine pour isoler certains *M. avium* déficients.

- Ensemencer un milieu liquide pour la recherche de *M. genavense*.

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 4/22
----------------------	--	---------------------	--------

## **B - Culture en milieu liquide**

### **1 - Technique radiométrique Bactec ® 460 TB (Becton Dickinson)**

#### ***a - Principe***

La méthode de respirométrie radiométrique Bactec consiste à apprécier la croissance des mycobactéries en mesurant la quantité de  $^{14}\text{CO}_2$  libérée par le métabolisme de l'acide palmitique marqué au  $^{14}\text{C}$  présent dans le milieu de culture 7H12. L'appareil Bactec<sup>®</sup> permet de mesurer la quantité de  $^{14}\text{CO}_2$  dans l'atmosphère gazeuse du flacon et de l'exprimer selon une graduation appelée GI (Growth Index) allant de 0 absence de  $^{14}\text{CO}_2$  à 999 correspondant à la quantité maximale de croissance décelable par l'automate.

#### ***b - Technique***

Toutes les inoculations dans le flacon 12B sont faites à la seringue à insuline (Plastipak 1 ml Sub-Q, Becton Dickinson réf. 305501).

Avant et après chaque manipulation, les opercules des flacons sont décontaminés avec un désinfectant mycobactéricide (cf. PR-HS-001).

#### **→ Préparation des flacons**

Avant l'ensemencement, l'atmosphère des flacons 12B doit être standardisée par administration d'un mélange gazeux convenable.

Ceci peut-être effectué une fois par semaine pour les flacons qui seraient utilisés pendant la semaine. Tout flacon donnant un index de croissance  $\geq 20$  ne devra pas être utilisé.

#### **1 - Prélèvements ayant subi une décontamination :**

Il s'agit de prélèvement initialement contaminés pour lesquels on complète l'effet de la décontamination en réalisant la culture en présence d'un mélange antibiotique susceptible d'inhiber la croissance des bactéries indésirables, sans perturber la culture des mycobactéries.

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 5/22
----------------------	--	---------------------	--------

Reconstituer le supplément PANTA avec 5 ml de solution de reconstitution (PRF). Il est possible d'ajouter à ce supplément de la Vancomycine (Lilly) à une concentration finale variable de 1 à 4 µg/ml selon les sites (PANTAV). Après reconstitution, ce supplément peut-être conservé à + 4°C au maximum pendant une semaine.

Ajouter 0,1 ml de ce mélange PANTA ou PANTAV à chaque flacon 12B avant l'ensemencement. Ce supplément peut-être ajouté 2 à 3 jours à l'avance à condition que les flacons soient conservés à + 4°C.

## 2- Prélèvements non contaminés :

Les prélèvements aseptiques doivent être ensemencés sans décontamination préalable directement en milieu 12B sans addition de PANTA. Il est nécessaire d'ajouter 0,1 ml de PRF seul (solution de reconstitution du PANTA) qui contient du stéarate de polyoxyéthylène (POES) pour favoriser la croissance des mycobactéries.

### → **Ensemencement des flacons**

Ensemencer 0,5 ml de culot de prélèvement (voir MO-MYC-002). Il est recommandé d'ensemencer en parallèle un milieu de Löwenstein-Jensen avec 0,2 ml de culot de prélèvement.

### → **Observation des cultures**

La lecture des flacons se fait sur l'appareil Bactec 460 TB 2 fois par semaine pendant les deux premières semaines puis 1 fois par semaine jusqu'à la fin de la 6<sup>ème</sup> semaine.

### **Remarques :**

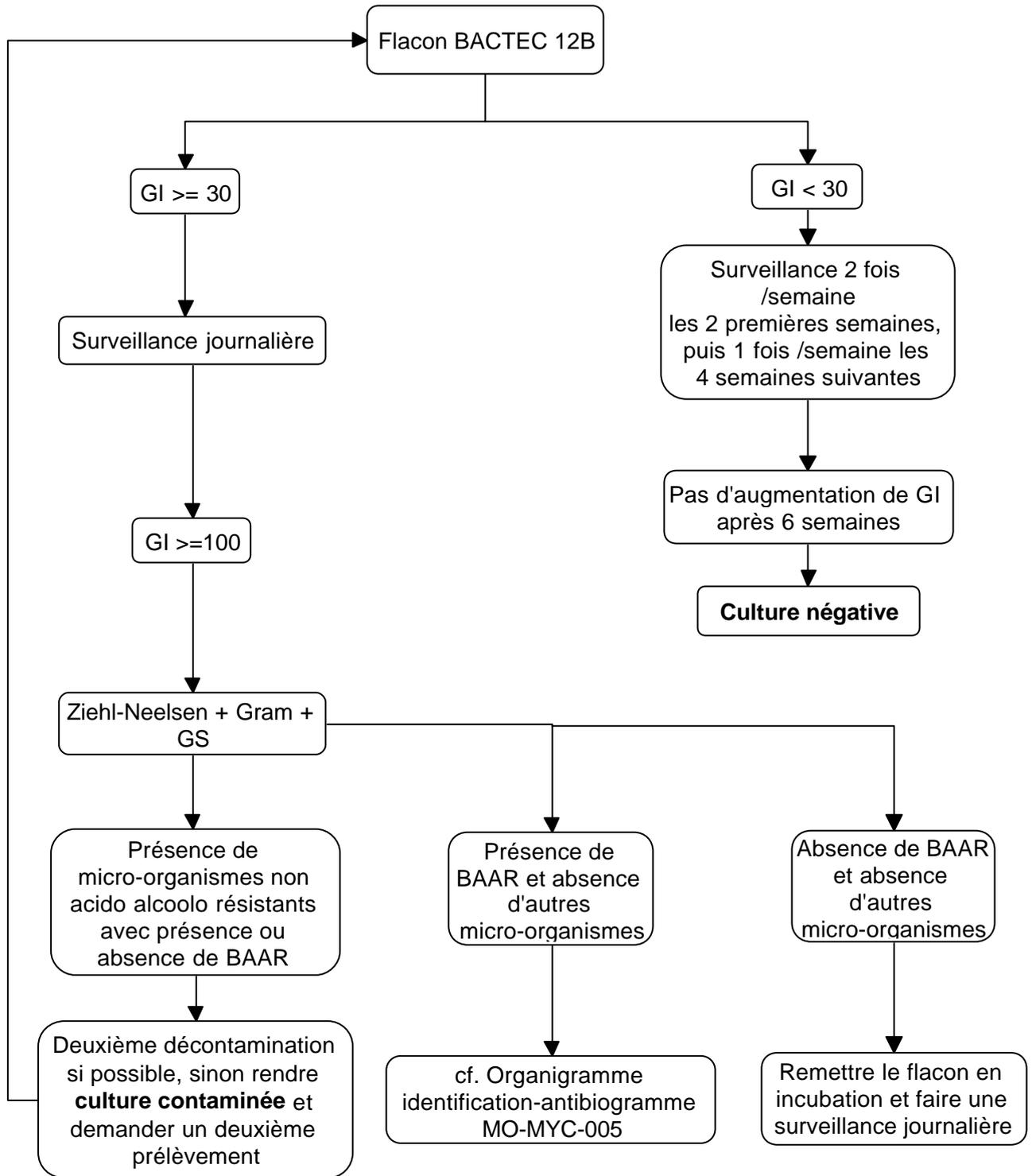
- ◆ Pour les prélèvements à frottis négatifs, la lecture peut être faite qu'une fois par semaine la première semaine. Pour les prélèvements à frottis très positifs (3+ à 4+), il est conseillé de faire la lecture tous les jours dès le lendemain de l'ensemencement.

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 6/22
----------------------	--	---------------------	--------

- ♦ Un index de croissance  $GI \geq 30$  est considéré comme potentiellement positif, et sera suivi par des lectures quotidiennes.
  
- ♦ Une augmentation rapide de l'index de croissance ou de la turbidité doit faire suspecter une contamination. On confirmera celle-ci par la réalisation d'une double coloration de gram et de Ziehl Neelsen. Une deuxième décontamination peut être envisagée à partir du prélèvement initial conservé à + 4°C ou à défaut après centrifugation du milieu contaminé et décontamination du culot (MO-MYC-002). Enfin, un nouveau prélèvement peut être demandé.
  
- ♦ Quand l'index de croissance est  $\geq 100$  faire un frottis et colorer par la méthode de Ziehl-Neelsen. Observer la présence de bâcilles acido-alcoolo résistants et leurs caractéristiques morphologiques (cordes, échelles, etc...) pour orienter l'identification (voir MO-MYC-005).
- ♦ Faire l'identification immédiate des cultures positives à l'aide de sondes nucléiques avant d'informer le clinicien.
  
- ♦ S'il n'y a pas d'augmentation d'index de croissance au bout de 6 semaines d'incubation, rendre la culture négative.

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 7/22
----------------------	--	---------------------	--------

### Surveillance des cultures en milieu BACTEC



Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 8/22
----------------------	--	---------------------	--------

## **2 - Technique de fluorescence manuelle : BBL ® MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube - Becton Dickinson)**

### ***a - Principe***

Cette méthode utilise un milieu 7H9 contenant un sel de Ruthénium. Cette substance émet une fluorescence d'autant plus vive que la pression partielle d'oxygène est plus faible. Le métabolisme microbien provoque une déplétion en oxygène et entraîne l'apparition d'une fluorescence dont l'intensité est proportionnelle au niveau de réduction du milieu.

### ***b - Technique***

#### **→ Préparation des tubes**

Reconstituer l'ampoule de supplément PANTA avec 3 ml d'eau distillée stérile. Cette solution peut-être aliquotée et congelée à -20°C pour conservation.

Dévisser le tube MGIT et ajouter de manière aseptique:

- 0,1 ml de PANTA reconstitué (voir page 5/21).
- 0,5 ml de MGIT-OADC.

#### **→ Ensemencement**

Ensemencer à la pipette 0,5 ml de culot de prélèvement (MO-MYC-002)

Fermer le tube et homogénéiser au vortex.

Incuber à 37°C pendant 8 semaines.

Il est recommandé d'ensemencer en parallèle un milieu Löwenstein Jensen avec 0,2 ml de culot de prélèvement.

#### **→ Observation des cultures**

##### **Préparation du témoin positif:**

Vider le bouillon d'un tube MGIT. Préparer une solution de sulfite de sodium à 0,4% (0,4 g dans 100 ml d'eau distillée).

Mettre 5 ml de la solution de sulfite de sodium dans le tube et laisser reposer 1 heure avant de l'utiliser. Ce témoin positif conservé à température ambiante ne pourra être utilisé au delà de 4 semaines. Le témoin négatif est réalisé par un tube MGIT non ensemencé.

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 9/22
----------------------	--	---------------------	--------

**NB :** Le témoin positif peut être également préparé en ensemençant un tube MGIT avec un bacille à Gram négatif, type *E. coli*.

**→ Lecture des tubes:**

Le tube MGIT doit être retiré du support et comparé aux tubes témoins.

Placer les tubes sous la lampe UV entre un tube témoin positif et un tube témoin négatif. Eviter de lire les tubes dans une pièce ensoleillée ou sous une lumière vive.

Rechercher les tubes MGIT émettant une fluorescence. La fluorescence se caractérise par une couleur orange vif dans le fond du tube et une réflexion orange sur le ménisque de la surface. Si la fluorescence du tube MGIT se rapproche de celle du tube témoin positif, la culture est positive. Si elle se rapproche de celle du tube témoin négatif, la culture est négative.

La croissance peut aussi être détectée par la présence d'une turbidité homogène ou non, de petits grains ou de flocons dans le milieu de culture.

Une coloration de Ziehl-Neelsen doit être faite sur les cultures positives pour contrôler la présence de bacilles acido-alcool résistants. En cas de frottis négatif, rechercher une éventuelle contamination bactérienne par une coloration de Gram.

Il faut rechercher l'apparition d'une fluorescence des tubes pendant huit semaines avant de déclarer les cultures négatives et de vérifier l'éventuelle présence d'une turbidité ou de petits grains avant de les éliminer.

### **3 - Système MB/BacT<sup>TM</sup> (Organon Teknika)**

#### ***a - Principe***

Le système MB/BacT utilise une méthode de détection qui en permanence évalue dans le flacon de culture, l'évolution de la croissance microbienne en mesurant grâce à un indicateur coloré convenable, la quantité de CO<sub>2</sub> élaboré. Le système de lecture complété d'un équipement informatique sophistiqué compare les mesures

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 10/22
----------------------	--	---------------------	---------

obtenues à un système algorithmique de référence et déclenche le signal de positivité quand la variation des différents paramètres est suffisante.

### ***b - Technique***

Toutes les manipulations sont faites à la seringue à insuline (type Plastipak 1 ml Sub-Q, Becton Dickinson réf. 305501).

Avant chaque manipulation, l'opercule des flacons est décontaminé avec un désinfectant mycobactéricide (ex: Hexanios de la Société ANIOS).

#### **→ Préparation des flacons**

##### **1 - Préparer le complément d'antibiotiques :**

Ajouter aseptiquement 10 ml de solution de reconstitution dans chaque flacon de complément d'antibiotiques MB/Bact.

Le complément d'antibiotiques peut être conservé 7 jours entre +2° et +8°C.

##### **2 - Prélèvements ayant subi une décontamination :**

Avant l'inoculation ajouter aseptiquement dans chaque flacon 0,5 ml de complément d'antibiotiques reconstitué.

##### **3 - Prélèvements non contaminés :**

Avant l'inoculation ajouter aseptiquement dans chaque flacon 0,5 ml de solution de reconstitution.

Une coloration rose du milieu indique que le complément ou la solution de reconstitution ont été ajoutés correctement.

#### **→ Ensemencement des flacons**

Ensemencer aseptiquement 0,5 ml de culot (MO-MYC-002).

Il est recommandé de procéder parallèlement à l'inoculation d'un tube de Löwenstein-Jensen.

Incuber à 37°C pendant 8 semaines.

#### **→ Observation des cultures**

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 11/22
----------------------	--	---------------------	---------

Introduire les flacons MB/Bact T inoculés dans le MB/Bact T selon les instructions figurant dans le manuel d'utilisation.

Sur les flacons jugés positifs, faire la coloration de Ziehl-Neelsen pour observer la présence de bacilles acido-alcool résistants et suivre la procédure habituelle d'identification.

Si la coloration de Gram révèle la présence d'autres germes que des mycobactéries demander, si possible, un nouveau prélèvement, sinon la totalité du contenu du flacon peut être soumise après centrifugation à une nouvelle décontamination (cf. MO-MYC-002).

Après 42 jours de séjour dans l'appareil, tout flacon qui ne montre aucun trouble ni aucune manifestation de culture est déclaré négatif. Si le contenu du flacon est trouble, prélever un échantillon pour repiquage et subculture.

#### **4 - Conditions particulières de culture**

Ensemencer un flacon complémentaire et l'incuber:

- à 30°C pour les lésions cutanées (*M. marinum*, *M. ulcerans*)
- à 42°C en cas de suspicion d'infection à *M. xenopi*

#### **C - Culture en milieu diphasique : BBL Septi-Check AFB™**

##### ***a - Principe***

Le dispositif MB Check est un ensemble diphasique qui associe un flacon contenant le milieu liquide 7H9 et un système prismatique contenu dans un tube qui se visse sur le flacon. Les faces du prisme sont recouvertes respectivement de milieu de Löwenstein-Jensen, de milieu 7H11 et de gélose au sang cuit.

Le culot de prélèvement est inoculé dans la phase liquide et, à intervalles réguliers, le flacon est retourné, ce qui permet l'ensemencement des faces du prisme avec le milieu liquide.

##### ***b - Technique***

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 12/22
----------------------	--	---------------------	---------

**→ Reconstitution du supplément pour culture de mycobactéries**

Reprendre le lyophilisat par 9 ml d'eau distillée stérile.

Une fois dissout, le supplément peut être conservé à l'abri de la lumière pendant 2 semaines entre +2°C et +8°C ou à - 20°C.

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 13/22
----------------------	--	---------------------	---------

### → Préparation des flacons

Ajouter 1 ml de supplément reconstitué à chaque flacon de milieu de base avant ensemencement.

Les flacons ainsi préparés peuvent être conservés à l'abri de la lumière pendant 2 semaines entre +2 et +8°C.

### → Ensemencement des flacons

Ensemencer 1 ml de culot de prélèvement (voir fiche technique de préparation des échantillons). Mélanger.

Mettre en place le prisme contenant les 3 phases solides sur le flacon. Retourner le flacon pour ensemencer le prisme.

Incuber en position verticale à 37°C.

### → Observation des cultures

Lecture quotidienne des flacons (bouillon + prisme) la première semaine pour détecter les mycobactéries à croissance rapide ou les contaminants éventuels.

Au delà de la 1ère semaine, lecture hebdomadaire pendant 3 mois. A chaque lecture, retourner le flacon pour ensemencer le prisme.

Un trouble dans le flacon ou des colonies sur le prisme sont des indicateurs de positivité. Faire une coloration de Ziehl-Neelsen et suivre les procédures habituelles d'identification (MO-MYC-005).

## D - Hémocultures

Deux techniques sont utilisées pour rechercher les mycobactéries dans les prélèvements sanguins.

### 1 - Technique Isolator 10

#### → Ensemencement

Prélever 10 ml de sang au lit du malade sur tube Isolator et retourner le tube à plusieurs reprises pour initier la lyse des cellules.

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 14/22
----------------------	--	---------------------	---------

Après centrifugation de 30 mn à 3000 g, désinfecter le bouchon et poser le capuchon de prélèvement à la presse Isostat.

Aspirer et éliminer le surnageant avec la pipette Isolator pour surnageant.

Homogénéiser le culot au vortex. Prélever la totalité du culot à la pipette Isolator pour culot de centrifugation.

Mettre 100 µl du culot dans 900 µl d'eau distillée stérile et ensemercer la totalité par inondation sur 4 tubes de milieu à l'oeuf (Löwenstein-Jensen ou Coletsos).

Ensemencer le reste du culot sur 6 tubes (4 à 5 gouttes par tube).

Bien répartir l'inoculum sur la surface du milieu de culture. Mettre à l'étuve à 37°C. Ne pas serrer les bouchons pour permettre l'évaporation de l'inoculum. Vérifier que les tubes restent bien à plat sur le portoir. Visser les tubes lorsqu'ils sont secs.

#### → Observation des cultures

La lecture des tubes est faite 1 fois par semaine. Les cultures sont incubées pendant 3 mois avant d'être considérées négatives.

## 2 - Technique radiométrique Bactec ® 460 TB (Becton Dickinson)

#### → Ensemencement

Le sang est recueilli soit sur tubes type Vacutainer (5 ml sur SDS) ou inoculé directement dans le flacon Bactec 13A (5 ml) avec l'adaptateur Bactec (réf. 4405380 Becton Dickinson). Les flacons 13A ne doivent pas être gazés avant l'ensemencement. Avant de les placer à l'étuve, introduire de façon aseptique 0,5 ml de milieu d'enrichissement. Il est livré en même temps que les flacons 13A.

#### → Observation des cultures

La lecture des flacons se fait à raison de 2 fois par semaine pendant les 2 premières semaines, puis 1 fois par semaine pour un total de 8 semaines. L'incubation peut être prolongée jusqu'à 3 mois pour la détection de mycobactéries de croissance difficile (*M. genavense*).

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 15/22
----------------------	--	---------------------	---------

Un index de croissance GI  $\geq 30$  est considéré comme susceptible d'être positif. Quand l'index de croissance atteint 50, réaliser un frottis et le colorer par la méthode de Ziehl-Neelsen. Suivre ensuite la procédure réservée aux flacons 12B.

Si la coloration de Ziehl-Neelsen est négative, remettre le flacon en incubation pour contrôler sur des GI plus importants.

**NB** : Ne pas inoculer le culot de sang traité par la technique de centrifugation-lyse Isolator dans les flacons de culture en milieu liquide car le tube Isolator contient des inhibiteurs.

### **3 - Technique de fluorescence Bactec® 9240 (Becton Dickinson)**

#### ***Principe***

Le système Bactec® 9240 utilise une méthode de détection qui en permanence évalue dans le flacon de culture grâce à la présence d'un sel de ruthénium, la fluorescence consécutive à la réduction du milieu sous l'influence de la croissance microbienne. Le système de lecture complété d'un équipement informatique sophistiqué compare les mesures obtenues à un système algorithmique de référence et déclenche le signal de positivité quand la variation des différents paramètres est suffisante.

#### **→ Ensemencement des flacons Bactec® Myco F/lytic**

5 ml de sang sont inoculés directement au lit du malade à l'aide d'un adaptateur (adaptateur Vacutainer réf : 364887 Becton Dickinson)

#### **→ Observation des cultures**

Les flacons sont incubés dans l'appareil Bactec 9240 selon la notice du fabricant. La durée d'incubation est programmée pour 42 jours.

Un signal sonore et visuel indique les flacons positifs. Sur ces flacons, faire une coloration de Ziehl-Neelsen pour observer la présence de bacilles acido-alcool résistants et suivre la procédure habituelle d'identification (MO-MYC-005).

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 16/22
----------------------	--	---------------------	---------

## IV - ANNEXES

### A - CULTURES EN MILIEU SOLIDE

#### 1 - Milieus prêts à l'emploi

##### - Milieu de Löwenstein-Jensen

Firme	Conditionnement	Bouchon	Code
Sanofi Diagnostic Pasteur	5	vis	55245
	50	vis	55247
	5	coton	55246
	50	coton	55248
BioMérieux	5	vis	41694
	100	vis	41699
Oxoid	10	vis	02083
Becton-Dickinson	10	vis	4320908
	100	vis	4320909

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 17/22
----------------------	--	---------------------	---------

**- Milieu de Coletsos**

<b>Firme</b>	<b>Conditionnement</b>	<b>Bouchon</b>	<b>Code</b>
Sanofi Diagnostics Pasteur	5	vis	53155
	50	vis	53157
	5	coton	53156
BioMérieux	5	vis	41904
	100	vis	41909
Oxoid	10	vis	36951
Becton-Dickinson*	20	vis	4356536

\* La longueur des tubes est non standardisée (140 X 17 mm); les tubes ne s'adaptent pas à tous les portoirs.

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 18/22
----------------------	--	---------------------	---------

## II - Milieux à reconstituer

Firme	Base pour milieu de	Conditionnement	Code
Sanofi Diagnostics Pasteur	Löwenstein-Jensen	450 g	69671
	Coletsos	450 g	69661
Difco	Löwenstein-Jensen	500 g	A5044417
	Middlebrook 7H10	500 g	A5083801
	Middlebrook 7H11	500 g	A5083801

### Préparation des milieux :

#### 1 - Milieu de Löwenstein-Jensen

- Mettre 37,2 g de milieu sec dans 600 ml d'eau distillée froide contenant 12 ml de glycérol pour bactériologie. Mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement en agitant constamment, puis porter 1 à 2 minutes à ébullition. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

- Préparer stérilement 1000 ml d'une suspension très homogène d'oeufs frais sans antibiotiques:

- Mettre à tremper les oeufs (environ 25 oeufs) dans une solution de soude à 5 % pendant 30 minutes.

- rincer à l'eau courante.

- les mettre 10 minutes dans de l'eau additionnée d'un volume égal d'alcool dénaturé (1 litre d'eau + 1 litre d'alcool).

- Les laisser sécher sous la hotte.

- Chaque oeuf est cassé dans un premier temps dans un bécher stérile puis son contenu est versé dans une éprouvette stérile jaugée de 1 litre.

**Tout oeuf suspect doit être jeté.**

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 19/22
----------------------	--	---------------------	---------

- Bien mélanger les oeufs, au mixer.
- Sous la hotte, filtrer le mélange, au chinois posé sur l'entonnoir.
- Mélanger aseptiquement 600 ml de base stérile et refroidie aux environs de 45-50°C et les 1000 ml d'oeufs entiers, toujours en évitant d'inclure des bulles d'air. Répartir stérilement le milieu complet en tubes stériles à raison de 6 ml par tube de préférence bouchés à vis.
- Coaguler en position inclinée, au coagulateur à trou, à l'étuve ou à l'autoclave à 85°C pendant 45 minutes.

## **2 - Milieu de Coletsos**

- Dissoudre 33,4 g de base déshydratée dans 600 ml d'eau distillée froide contenant 12 ml de glycérol pour bactériologie. Mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement en agitant constamment, puis porter à ébullition pendant 2 minutes. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.
- Préparer stérilement 800 ml d'oeufs frais entiers et 200 ml de jaunes seuls (voir préparation des oeufs pour milieu de Löwenstein-Jensen).
- Mélanger aseptiquement et parfaitement les 600 ml de base stérile et refroidie aux environs de 45-60° C et l'ensemble des oeufs, en évitant d'inclure des bulles d'air. Répartir stérilement le milieu complet en tubes stériles de préférence bouchés à vis.
- Coaguler en position inclinée, au coagulateur à trou, à l'étuve ou à l'autoclave à 85°C pendant 45 minutes.

## **3 - Milieux de Löwenstein-Jensen enrichis**

### **1 - Avec du pyruvate de sodium**

#### - à partir de milieu déshydraté

- Préparation de 100 tubes de milieu de Löwenstein-Jensen-enrichi avec 0,2 % de pyruvate de sodium: mettre stérilement dans un Erlenmeyer 600 ml de milieu de Löwenstein-Jensen avant coagulation. Ajouter stérilement 6 ml de

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE</b> <b>Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 20/22
----------------------	--	---------------------	---------

pyruvate de Na à 20 % (ampoules de 5 ml - Institut Pasteur réf. 62535 - à conserver à + 4°C). Bien agiter et répartir en tubes à raison de 6 ml par tube.

- Coaguler en position inclinée, au coagulateur à trou, à l'étuve ou à l'autoclave à 85°C pendant 45 minutes.

- à partir de milieu de Löwenstein-Jensen prêt à l'emploi

- Les tubes de Löwenstein-Jensen sont imprégnés avec 0,2 ml d'une solution mère d'acide pyruvique (Merck réf. 6619) à 6 % de façon à obtenir une concentration finale de 0,2 %.

## **2 - Avec mycobactine J.**

- Dissoudre la mycobactine (réf mycobactine J 2 mg ; Rhône Mérieux, Lyon) en solution alcoolique à 0,05 % (2 mg de mycobactine dans 4 ml d'éthanol absolu). Ajouter la préparation à 1 litre de milieu de Löwenstein-Jensen avant coagulation. Ce milieu est utilisé pour la culture de souches de *M. avium* déficientes dans la synthèse de mycobactine.

## **3 - Avec du citrate de fer ammoniacal à 15 mg/ml.**

- Faire une solution de citrate de fer ammoniacal à 1000 mg/ml dans l'eau distillée. Répartir 0,1 ml à la surface d'un tube de milieu de Löwenstein-Jensen. Ce milieu est utilisé pour la culture de *M. haemophilum*.

Dans tous les cas, les tubes doivent être stockés à + 4°C et à l'obscurité. Il est conseillé de soumettre un échantillonnage de chaque lot préparé à un contrôle de qualité et de stérilité.

## **4 - Milieu Middlebrook 7H11 - 7H10**

Les milieux de base gélosés 7H11 ou 7H10 sont préparés selon les recommandations du fabricant, l'OADC (Difco A5 - 0722 -73), 20 ml pour 180 ml de base, sont ajoutés à 56°C avant gélification du milieu.

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 21/22
----------------------	--	---------------------	---------

## **B - CULTURES EN MILIEU LIQUIDE (hormis hémocultures)**

### **1 - Technique radiométrique Bactec ® 460 TB (Becton Dickinson)**

<b>Désignation du produit</b>	<b>Conditionnement</b>	<b>Code</b>
Bactec 12B : milieu Middlebrook 7H12 pour isolement des mycobactéries dans des prélèvements autres que le sang (avec substrat C <sup>14</sup> ) <sup>++</sup>	100 flacons	4402004
Bactec PANTA PLUS (additif d'antibiotiques)	250 tests	4404764

<sup>++</sup> livraison après avis favorable de la CIREA

**NB :** Pour les références concernant le matériel consommable et la maintenance du TB 460 consulter la notice du fabricant.

### **2 - Technique de fluorescence manuelle : BBL ® MGIT (Becton Dickinson)**

<b>Désignation du produit</b>	<b>Conditionnement</b>	<b>Code</b>
Tubes MGIT BBL ® : Middlebrook 7H9 modifié	25 tubes	4345111
Tubes MGIT BBL ® : Middlebrook 7H9 modifié	100 tubes	4345113
MGIT OADC BBL ® : 15 ml de supplément d'enrichissement	6 ampoules	4345116
MGIT PANTA BBL ® pour 150 tests	6 ampoules	4345114

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 22/22
----------------------	--	---------------------	---------

### 3 - Système MB/BacT™ (Organon Teknika)

Désignation du produit	Conditionnement	Code
Flacons de culture MB/BacT	100 flacons	59591
Kit de décontamination MB/BacT	100 tests	59760
- complément d'antibiotiques MB/BacT	5 flacons/kit	
- solution de reconstitution MB/BacT	5 flacons/kit	

**NB :** Pour la maintenance du MB/BacT consulter la notice du fabricant.

## C - CULTURES EN MILIEU DIPHASIQUE

### I - Milieux de culture : BBL ® Septi - Check™<sub>AFB</sub> (Becton Dickinson)

Désignation du produit	Conditionnement	Code
AFB BBL ® Septi-Check bouillon : base liquide Middlebrook 7 H9	10 flacons	4343558
AFB BBL ® Septi-Chek lame gélosée	10 lames	4343559
AFB BBL ® Septi-Check : supplément pour enrichissement et PANTA	5 flacons	4343560

Azay - Mycobactéries	<b>MODE OPERATOIRE Culture des mycobactéries</b>	MO-MYC-003 Rev A	P 23/22
----------------------	--	---------------------	---------

## D - HEMOCULTURES

### - Becton-Dickinson

Désignation du produit	Conditionnement	Code
Bactec 13A avec supplément : milieu Middlebrook 7H13 pour isolement des mycobactéries dans le sang (avec substrat C <sup>14</sup> ) <sup>++</sup>	50 flacons	4402018
Bactec 13A : milieu Middlebrook 7H13 (avec substrat C <sup>14</sup> ) <sup>++</sup>	12 flacons	4402121
Myco/F lytic : milieu Middlebrook 7H9 modifié	50 flacons	4402288

<sup>++</sup> livraison après avis favorable de la CIREA

### - Unipath-Oxoid

Désignation du produit	Conditionnement	Code
Tubes Isolator 10 BC 507C	25 tubes	57781
Presse Isostat et portoir		57811
Consommable BC 509 C (capuchon de prélèvement pipette surnageant et pipette culot)	100	57801
Adaptateur pour centrifugeuse BC 501C		57821