

Protocole de filtration d'eau pour culture des mycobactéries**1. Objectif / but de l'analyse :**

Le but de cette procédure est de décrire la filtration d'eau pour la recherche de mycobactéries.

2. Principe de la méthode / contexte / domaine d'application :

Une alerte mondiale a été déclenchée à l'effet que le système d'échangeur thermique 3T de Sorin utilisé dans les centres de chirurgie cardiaque pouvait être contaminé par *Mycobacterium chimaera* et infecter des patients (1, 2, 3).

Ce protocole a été développé au Québec pour :

1. Filtrer et concentrer les Mycobactéries à des fins d'isolement et de détection;
2. Faire un décompte bactérien présent dans les eaux des générateurs thermiques.

Cette méthode s'applique à tous les centres de chirurgie cardiaque utilisant ce type de générateur thermique et aux laboratoires de microbiologie hospitaliers.

M. chimaera est une mycobactérie à croissance lente (4 à 6 semaines) qui fait partie du complexe MAC et qui peut se retrouver dans l'eau et l'environnement. Son isolement à partir des échantillons d'eau peut s'avérer difficile et lent puisque d'autres microorganismes à croissance rapide, même à faible quantité, peuvent prédominer en culture. C'est pourquoi il est nécessaire de concentrer et décontaminer les échantillons d'eau pour favoriser la croissance des mycobactéries.

REMARQUES :

1. *M. chimeara* est libéré dans l'eau à partir d'un biofilm dans l'appareil.
2. D'autres bactéries hétérotrophes participent probablement à l'existence du biofilm.
3. L'essaimage bactérien (« shedding ») est inconstant et dépend de l'importance du biofilm. D'importants volumes d'eau (ad 4 litres) ont été parfois nécessaires pour le mettre en évidence.
4. L'eau du robinet contient généralement des MNT d'autres espèces (MAC et *M. gordonae*).
5. La concentration par filtration est recommandée selon des études « spikée » et montre une perte d'environ 1 log (90%), alors que la concentration par centrifugation montre une perte d'environ 2 log (99.8%).

6. La numération des MNT n'est pas recommandée (sauf pour des fins de recherche).
7. La numération des autres bactéries hétérotrophes sur géloses standard peut-être utile pour un contrôle de qualité de l'eau, valider l'efficacité de la filtration et l'élimination du biofilm.

3. Définitions / abréviations / acronymes :

#gbm : Numéro de génie biomédical
MNT : Mycobactéries non tuberculeuses
MAC : Mycobacterium avium complex
UCF : Unité formant colonie
ABV : absence de bactérie visible

4. Responsabilités :

Les technologistes sont responsables de générer des résultats de qualité conformes à cette procédure.

Les microbiologistes-infectiologues sont responsables de s'assurer qu'une procédure à jour existe ainsi que d'en valider les résultats.

La recherche et analyse de MNT doit être effectuée au niveau de confinement 2.

5. Analyse :

Deux échantillons d'eau sont traités indépendamment (100 ml pour la recherche des mycobactéries et 1L pour le décompte des bactéries hétérotrophes).

5.1. ÉCHANTILLONNAGE (PRÉLÈVEMENT)

5.1.1. Prendre deux échantillons : un de 100 ml (ou plus) (cf aux PON¹) et un autre de 1L d'eau provenant d'une des vannes de vidange à l'arrière de l'appareil avant le décompte hétérophile :

5.1.1.1. Désinfecter la sortie du liquide avec de l'alcool

5.1.1.2. Effectuer le prélèvement avec des gants

5.1.1.3. Durant le prélèvement, laisser l'intérieur du bouchon vers le bas

5.1.1.4. Fermer le récipient le plus rapidement possible et l'amener immédiatement au laboratoire ou le mettre sous glace

5.1.1.5. Fournir l'information (jours, date, heure, # inventaire de l'appareil) sur les prélèvements au génie biomédical

¹ PON pour les générateurs thermiques 3T de Sorin : procédure de désinfection en profondeur, procédure de désinfection des circuits d'eau et procédure de renouvellement de l'eau.

5.2. RÉCEPTION AU LABORATOIRE

- 5.2.1. Si besoin d'un décompte hétérotrophe, traiter un échantillon de 1000 ml pour numération bactérienne immédiatement sinon garder réfrigéré pour ultérieurement (cf PON : bactériologie générale) ou 0.45 µm pour des volumes supérieurs à 1 L.
- 5.2.2. Filtrer l'échantillon de 100 ml (ou plus) pour la recherche des mycobactéries avec un filtre de 0.2 µm.
N.B. Pour la désinfection des circuits d'eau ou le renouvellement d'eau, les volumes sont de 250 ml.

5.3. FILTRATION (L'appareillage peut varier : cf. description technique)

- 5.3.1. Stériliser le système, dans le laboratoire de microbiologie
- 5.3.2. Sous une hotte :
 - 5.3.2.1. Ouvrir le bouchon du système de filtration
 - 5.3.2.2. Prendre l'échantillon de 100 ml et le verser dans le système de filtration
 - 5.3.2.3. Fermer le bouchon du système de filtration
- 5.3.3. Connecter le système de filtration à la pompe (cf. Procédure de filtration)
- 5.3.4. Mettre la pompe en marche pour créer un vide
- 5.3.5. Déconnecter le système de filtration de la pompe
- 5.3.6. Sous une hotte
 - 5.3.6.1. Ouvrir le bouchon du système de filtration
 - 5.3.6.2. Récupérer le filtre avec une pince stérile et placer le filtre dans un contenant pour le vortex
 - 5.3.6.3. Ajouter 5 ml d'eau stérile distillée dans le contenant qui inclut le filtre
 - 5.3.6.4. Vortex du contenant pendant 1 à 2 min
 - 5.3.6.5. Récupérer le filtre et s'en débarrasser
 - 5.3.6.6. Fermer le contenant
 - 5.3.6.7. Fermer le bouchon du système de filtration
- 5.3.7. Envoyer le contenant qui inclut le 5 ml au laboratoire qui traite la culture des mycobactéries, pour décontamination et culture des mycobactéries. Assurez-vous qu'une culture sur milieu solide et liquide sera faite

5.4. ANALYSE PAR PCR

- 5.4.1.1. Envoyer 2,5 ml au LSPQ avec le formulaire (No1)
- 5.4.1.2. Avec le restant de filtrat, étalez une goutte sur lame

- 5.4.1.3. Faire une coloration à l'acridine orange et un Zeihl Neilson selon les procédures de laboratoires.
- 5.4.1.4. Lire au microscope à fluorescence et faire une estimation + à 4+ ou ABV
- 5.4.1.5. Consignez le résultat et le faire parvenir à l'URDM ou au responsable de l'appareil
- 5.4.1.6. Réfrigérer le reste pour analyse ultérieure ou procéder à la culture, voir section 5.4.2.

5.4.2. CULTURE DE MYCOBACTÉRIES

- 5.4.2.1. Le filtrat restant (environ 2.0 ml) est traité, comme un échantillon clinique, par décontamination au NaOH selon votre procédure en vigueur.
- 5.4.2.2. Ensemencer un tube en milieu liquide (MGIT ou MB/BACT) et un autre milieu solide (LJ ou 7H10)
- 5.4.2.3. L'incubation est faite jusqu'à la positivité ou pour un maximum de 6 semaines en milieu liquide et de 8 semaines en milieu solide
- 5.4.2.4. Envoyer une culture positive au LSPQ pour identification

5.5. DÉCOMPTE BACTÉRIEN HÉTÉROTROPHE

Le dénombrement bactérien par filtration sur membrane consiste à recueillir et dénombrer à la surface d'une membrane filtrante stérile les bactéries hétérotrophes viables présentes, sans spécifier le type de bactéries.

- 5.5.1. Reprenez le filtre (du 1L) et le déposer, à l'aide d'un pince stérile sur une gélose R2A ou équivalent.
- 5.5.2. Incuber la boîte de Pétri à une température entre 20 et 28°C pendant 7 jours
- 5.5.3. Effectuer le dénombrement des bactéries sur le filtre, de préférence à l'aide d'un stéréomicroscope réglé à un grossissement (10X à 15X), de manière à voir le champ complet de la boîte de Pétri
- 5.5.4. Les résultats sont exprimés en UFC/ml.

6. Références :

1. Food and Drug Administration. Mycobacterium chimaera infections associated with Sorin Group Deutschland GmbH Stöckert 3T Heater-Cooler System: FDA Safety Communication. June 1, 2016. Washington, DC: US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration; 2016.
<http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/ucm504213.htm>
2. Sax H, Bloemberg G, Hasse B, et al. Prolonged outbreak of Mycobacterium chimaera infection after open-chest heart surgery. Clin Infect Dis 2015;61:67–75

3. Perkins KM, Lawsin A, Hasan NA, et al. Notes from the Field. Mycobacterium chimaera Contamination of Heater-Cooler Devices Used in Cardiac Surgery — United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2016;65:1117–1118

4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, Approved Guideline, 4th edition, CLSI document C3-A4, Pennsylvania 19087-1898, USA

7. Diffusion :

Selon les procédures de votre laboratoire.

8. Versions :

Versions	Date	Auteurs	Modifications
1.0	2016-02-17	Richard Marchand Hafid Soualhine Alexia Bouchard-Saindon	Création de la procédure (une première version a été faite depuis Septembre 2015 avec un autre ingénieur (Nima) puis après avec Alexia en Février 2016
2.0	2016-10-28	Richard Marchand Hafid Soualhine	Mise en forme PON Ajout décompte bactérien
3.0	2017-02-17	Richard Marchand	Ajout procédure PCR