BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA)
et
BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) – boîte à double compartiment

L007379 • Rev. 09 • Décembre 2006

PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE

I INTRODUCTION

La Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**) est un milieu sélectif servant à l'isolement et l'identification présomptive des streptocoques du groupe A à partir de cultures d'écouvillonnages de gorge ou d'autres échantillons. La **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) sert à cultiver des microorganismes exigeants et à visualiser des réactions hémolytiques. Le compartiment de la boîte contenant le milieu TSA II porte le chiffre « I » et le compartiment contenant le milieu **ssA**, le chiffre « II ».

II MODE OPERATOIRE DU TEST

A. Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood

1. Ensemencer des échantillons représentatifs avec des cultures diluées à 10^3 to 10^4 UFC/0,01 mL.
   a. A chaque boîte, ajouter 0,01 mL de la dilution et strier pour obtenir des colonies isolées. Piquer la zone de striage principale avant de strier le reste de la boîte.
   b. Placer un disque **Taxo** A à l'intersection de la première et la seconde zone de striage de chaque boîte ensemencée avec des souches *S. pyogenes*.
   c. Incuber les boîtes à 35 ± 2 °C, en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone.
   d. Inclure des boîtes de **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) comme contrôles non sélectifs pour l'ensemble des microorganismes.
2. Examiner les boîtes après 18 à 24 h pour déceler une bêta-hémolyse dans la zone piquée et évaluer le taux de croissance, l'inhibition, la taille des colonies et les réactions hémolytiques. Evaluer et noter la taille de la zone entourant le disque **Taxo** A avec *S. pyogenes*.
3. Résultats attendus

Streptococcus pyogenes (2 souches) *ATCC 19615 ATCC 51574	Croissance moyenne à importante (suivant la souche et la dilution) de colonies minuscules ou de très petite taille entourées de zones de bêta-hémolyse. Une zone d'inhibition de la croissance entoure clairement le disque **Taxo** A.
Streptococcus mitis ATCC 6249	Inhibition partielle
**Staphylococcus aureus* ATCC 25923	Inhibition totale
Neisseria subflava ATCC 14799	Inhibition totale
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Inhibition totale

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

B. Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

1. Ensemencer des échantillons représentatifs avec des dilutions des cultures répertoriées ci-dessous.
   a. A l'aide d'une multipipette volumétrique ou équivalent, distribuer 0,01 mL de la dilution contenant 30 à 300 UFC dans chaque boîte et ensemencer par étalement à l'aide d'un étaleur en verre stérile.
   b. Incuber la souche de *Staphylococcus* à 35 ± 2 °C en atmosphère aérobie et la souche de *Streptococcus* à 35 ± 2 °C en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone.
2. Examiner les boîtes après 18 à 24 h pour évaluer la croissance bactérienne, la taille des colonies et les réactions hémolytiques.

3. Résultats attendus

Souches de contrôle CLSI (souches ATCC)
**Streptococcus pyogenes*……. Croissance, bêta-hémolyse
(19615)
**Streptococcus pneumoniae*…. Croissance, alpha-hémolyse
(6305)
**Staphylococcus aureus*…… Croissance
(25923)
**Escherichia coli*..... Croissance
(25922)

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

III CONTROLE DE QUALITE SUPPLEMENTAIRE

1. Examiner les boîtes comme indiqué à la rubrique « Détérioration du produit ».
2. Inspecter visuellement des boîtes représentatives pour s'assurer qu'aucun défaut physique ne peut interférer avec leur utilisation.
3. Mesurer le pH par potentiométrie à température ambiante et s'assurer qu'il est conforme à la spécification de 7,4 ± 0,2 pour chaque milieu.
4. Noter la fermeté des boîtes pendant l'ensemencement.
5. Incuber des boîtes représentatives non ensemencées à 35 ± 2 °C et les examiner après 72 h pour déceler une contamination microbienne éventuelle.

INFORMATIONS PRODUIT

IV APPLICATION

La Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**) (gélose sélective des streptocoques du groupe A contenant 5 % de sang de mouton) est recommandée comme milieu d'étalement principal servant à l'isolement primaire des streptocoques du groupe A à partir de cultures d'écouvillonnages de gorge ou d'autres échantillons dans lesquels on soupçonne la présence de *S. pyogenes*. Les streptocoques du groupe B se développent également sur ce milieu ; la croissance de la plupart des autres streptocoques, *Neisseria*, staphylocoques et bactéries à Gram négatif est inhibée. Le milieu est conçu pour s'utiliser conjointement avec les disques **Taxo** A (bacitracine, 0,04 unité) pour l'identification présomptive des streptocoques de *S. pyogenes*.

La **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) (gélose de soja **Trypticase** complémentée de 5 % de sang de mouton) sert à cultiver des microorganismes exigeants et à visualiser les réactions hémolytiques produites par de nombreuses espèces bactériennes.

V RESUME ET EXPLICATION

Une infection par des streptocoques du groupe A de Lancefield (*S. pyogenes*) risque d'entraîner de graves séquelles comme le rhumatisme articulaire aigu et la glomérulonéphrite aiguë. Par conséquent, une détection et une identification précoces sont importantes.

Les qualités nutritionnelles de la **Trypticase** Soy Agar (TSA) en ont fait un milieu très employé, à la fois comme milieu non complémenté et comme base des milieux au sang. La **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) est largement utilisée pour mettre en évidence et cultiver des espèces microbiennes exigeantes et visualiser des réactions hémolytiques qui constituent des critères de différenciation importante des bactéries, notamment *Streptococcus* sp.

Comme la flore normalement présente dans les écouvillonnages de gorge cultivés en routine par étalement sur boîte de gélose au sang finit par supplanter les autres microorganismes, des ingrédients sélectifs ont été ajoutés à la gélose au sang de mouton pour favoriser la détection des streptocoques du groupe A.

L'évaluation en laboratoire de différents agents antimicrobiens a permis de définir une association présentant une sélectivité améliorée par rapport aux autres milieux sélectifs testés. Ce milieu, appelé **ssA**, permet une identification présomptive des streptocoques du groupe A d'après leur sensibilité à la bacitracine et les réactions de bêta-hémolyse, dans les 24 h suivant l'ensemencement de l'échantillon lorsque le milieu est incubé en atmosphère enrichie en CO_2.[1]

La boîte double, qui contient de la gélose au sang non sélective (TSA II) dans le compartiment « I » et de la gélose au sang sélective (**ssA**) dans le compartiment « II », permet de mettre en évidence des streptocoques du groupe A et d'évaluer l'ensemble des microorganismes présents dans l'échantillon sur une même boîte.

VI PRINCIPES DE LA METHODE

L'association de la caséine et des peptones de soja dans la base de gélose de soja **Trypticase** rend le milieu hautement nutritif en fournissant une source d'azote organique. Le chlorure de sodium assure l'équilibre osmotique du milieu.

Le sang de mouton défibriné permet de visualiser les réactions hémolytiques produites par les streptocoques. En outre, la croissance de *Haemophilus hemolyticus*, une bactérie non pathogène dont les colonies hémolytiques sont impossibles à distinguer de celles des streptocoques bêta-hémolytiques, est inhibée.

La **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) permet une excellente croissance *Streptococcus pyogenes* (Lancefield du groupe A) accompagnée de réactions bêta-hémolytiques, ainsi qu'une excellente croissance d'autres microorganismes exigeants produisant les réactions hémolytiques attendues. Elle peut être utilisée avec des disques de bacitracine faiblement dosés (0,04 unité) (**Taxo** A) pour l'identification présomptive des streptocoques du groupe A (*S. pyogenes*).

La Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**) est une **Trypticase** Soy Sheep Blood Agar (TSA II) complémentée d'agents sélectifs visant à inhiber la croissance de la flore microbienne habituellement présente dans les écouvillonnages de gorge, afin de faciliter la mise en évidence de *S. pyogenes*. Le sang de mouton défibriné apporte un supplément de croissance à ces microorganismes exigeants et permet de visualiser les réactions de bêta-hémolyse typiques de *S. pyogenes*. Les streptocoques bêta-hémolytiques, qui présentent une zone d'inhibition autour d'un disque à la bacitracine (0,04 unité), peuvent être identifiés de façon présomptive comme des streptocoques du groupe A.

VII REACTIFS

Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA)

Formule approximative* par litre d'eau purifiée

Digestion pancréatique de caséine	14,5 g
Digestion papaïque de semoule de soja	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Gélose	14,0 g
Facteurs de croissance	1,5 g
Agents sélectifs	40,2 mg
Sang de mouton défibriné	5 %

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

Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)

Formule approximative* par litre d'eau purifiée

Digestion pancréatique de caséine	14,5 g
Digestion papaïque de semoule de soja	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Gélose	14,0 g
Facteurs de croissance	1,5 g
Sang de mouton défibriné	5 %

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

Avertissements et précautions

Réservé au diagnostic *in vitro*.

En présence d'une condensation excessive, poser de biais un rebord du fond sur un rebord du couvercle retourné pour sécher la condensation afin d'empêcher la formation d'un joint entre la partie supérieure et la partie inférieure de la boîte pendant l'incubation.

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 »[2-5] 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 boîtes préparées, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé avant de les éliminer.

Instructions pour la conservation

Dès réception, conserver les boîtes 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. Conservées dans leur emballage d'origine, à une température comprise entre 2 et 8 °C, jusqu'au moment de l'utilisation, les boîtes préparées peuvent être ensemencées jusqu'à la date

de péremption et incubées pendant les durées d'incubation recommandées. Laisser le milieu s'équilibrer jusqu'à température ambiante avant de l'ensemencer.

Détérioration du produit
Ne pas utiliser les boîtes si elles présentent des signes de contamination microbienne, décoloration ou dessiccation, ou d'autres signes de détérioration.

VIII PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons prélevés dans la gorge adaptés à la mise en culture s'obtiennent par écouvillonnage du pharynx et de la région tonsillaire à l'aide d'un écouvillon à embout polyester ou polyuréthane, en prenant soin de ne pas toucher la langue ou la luette. (Remarque : Si l'on emploie également des écouvillons pour réaliser les tests de détection directe d'antigène, il est indispensable d'utiliser des écouvillons à embout rayonne ou polyuréthane, comme les systèmes de prélèvement et de transport **CultureSwab** et **CultureSwab** EZ.) Des échantillons autres que les écouvillonnages de gorge peuvent être cultivés en respectant les méthodes recommandées. Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.[6,7]

IX METHODE

Matériaux fournis
Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**) et **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) – boîte à double compartiment

Matériaux requis mais non fournis
Milieux de culture auxiliaires, réactifs, souches de contrôle de qualité et matériel de laboratoire requis.

Mode opératoire du test
La surface de la gélose doit être lisse et humide, mais sans excès d'humidité.

Strier le milieu avec l'échantillon dès que possible après réception au laboratoire. La boîte d'étalement sert principalement à isoler des cultures pures à partir d'échantillons contenant des flores mixtes. Si le prélèvement est mis en culture directement à partir d'un écouvillon, rouler l'écouvillon sur une petite partie de la gélose au niveau du bord de la boîte, puis strier la gélose à partir de cette zone ensemencée. Sans stériliser de nouveau l'ensemenceur à anse, piquer la gélose à deux ou trois reprises dans les zones les plus fortement ensemencées.

Lorsque la boîte est ensemencée avec un même échantillon, ensemencer d'abord le compartiment TSA II, qui porte le numéro « I ». Puis, ensemencer le compartiment **ssA**, identifié « II », et placer un disque **Taxo** A sur la portion du compartiment ensemencée avec l'écouvillon, c'est-à-dire à l'intersection de la portion ensemencée avec l'écouvillon et de la zone initialement striée avec un ensemenceur à anse.

Incuber les boîtes ensemencées à 35 ± 2 °C, en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone. Si les boîtes sont incubées en l'absence de dioxyde de carbone, la taille des zones de réaction bêta-hémolytique et des colonies sera plus petite et les colonies seront visibles en nombre plus restreint.

Examiner les boîtes après 18 à 24 h.

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

Après 18 à 24 h d'incubation en atmosphère enrichie en dioxyde de carbone, les streptocoques du groupe A (*S. pyogenes*) forment sur **ssA** des colonies translucides ou opaques, blanches à grises, de petite taille (1 à 2 mm) entourées d'une zone de bêta-hémolyse. Une diminution de la taille des colonies comparativement au milieu de contrôle non sélectif (**Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood) est typique. On peut observer le développement de colonies minuscules ou de très petite taille de streptocoques non hémolytiques, alpha-hémolytiques ou bêta-hémolytiques, mais elles ne doivent pas interférer avec la mise en évidence des streptocoques du groupe A ni avec

l'interprétation des résultats. La croissance de *Neisseria* sp., des streptocoques *viridans*, des staphylocoques, des bacilles à Gram négatif et de la plupart des streptocoques bêta-hémolytiques autres que les streptocoques des groupes A et B est inhibée sur milieu **ssA**. La sensibilité à la bacitracine peut être utilisée pour différencier les streptocoques du groupe A de ceux du groupe B. Une croissance moyenne à importante de colonies bêta-hémolytiques associée une zone d'inhibition autour du disque **Taxo** A peut être rapportée comme une identification présomptive de *S. pyogenes*. Un test PYR (acide pyroglutamique) doit également être effectué. Il est plus spécifique et aussi sensible que le test à la bacitracine employé à cette fin.[7] Une coloration de Gram doit être effectuée pour confirmer l'observation macroscopique.

Un test de groupage sérologique peut être effectué en présence d'un nombre suffisant de colonies bêta-hémolytiques bien isolées.

XI LIMITES DE LA PROCEDURE

Aucun milieu n'étant parfait, certaines souches de streptocoques du groupe A (*S. pyogenes*) parviennent, bien que difficilement, à se développer sur le milieu **ssA** ; la nature des échantillons et l'état physiologique des microorganismes peuvent influer sur la mise en évidence des espèces recherchées et modifier les effets inhibiteurs du milieu. Par conséquent, il est utile de comparer la croissance observée dans les deux compartiments de la boîte pour recueillir des informations complémentaires et garantir une mise en évidence optimale des pathogènes éventuels.

Ce milieu d'étalement préparé est conçu pour réaliser un isolement primaire. Certains tests diagnostiques peuvent être réalisés sur boîte d'isolement primaire. Cependant, une culture pure est recommandée pour réaliser des tests biochimiques et des analyses sérologiques. Consulter les publications citées en référence pour plus d'informations sur les méthodes recommandées.[6-8]

XII CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Dans une étude clinique portant sur 460 écouvillonnages de gorge, 117 échantillons se sont avérés positifs pour les streptocoques du groupe A sur Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**), contre 100 échantillons sur SXT Sheep Blood Agar et 84 échantillons sur **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II). Parmi ces cultures positives, 103 ont été identifiées sur la base de la bêta-hémolyse observée et de la sensibilité à la bacitracine (0,04 unité) dans les 24 h sur **ssA**, contre 80 sur SXT et seulement 32 sur le contrôle de gélose au sang non sélective TSA.[9]

XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	**Description**
221783	**BBL** Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**) // **BBL Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II), coffret de 20 boîtes à double compartiment

XIV REFERENCES

1. Evans, G.L., and T.E. O'Neill. 1984. Development of an improved selective medium for the isolation of group A streptococci from throat cultures, abstr. C-136, p. 259. Abstr. 84th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1984.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
7. Ruoff, K.L., R.A. Whiley, and D. Beighton. 1999. *Streptococcus*, p. 283-296. *In* P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Yolken (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, and W.C. Winn, Jr. 1997. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia.
9. Carlson, J.R., W.G. Merz, B.E. Hansen, S. Ruth, and D.G. Moore. 1985. Improved recovery of group A beta-hemolytic streptococci with a new selective medium. J. Clin. Microbiol. *21*:307-309.

Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 USA
800-638-8663

EC REP BENEX Limited
Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate
Shannon, County Clare, Ireland
Tel: 353-61-47-29-20
Fax: 353-61-47-25-46

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection. BD, BD Logo, BBL, CultureSwab, ssA, Taxo and Trypticase are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2006 BD