

BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate)

APPLICATION

La BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate) (gélose MacConkey II /gélose BD Columbia ANC Améliorée II avec 5 % de sang de mouton en boîte de Pétri à deux compartiments) est un milieu amélioré utilisé pour l'isolement sélectif des bactéries Gram négatives et Gram positives à partir d'échantillons cliniques.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.

La gélose MacConkey est l'une des premières formulations mises au point (publiée en 1900 par MacConkey) pour l'isolement, la culture et l'identification des *Enterobacteriaceae* et de certains non fermentants. Par la suite, ce milieu a été modifié à diverses reprises.^{1,2}

La gélose MacConkey II a été formulée en 1987 afin de mieux inhiber l'essaimage des *Proteus* spp., d'obtenir une différenciation plus nette des fermentants et non fermentants du lactose et de stimuler la croissance des bactéries entériques. Dans la gélose MacConkey II, des peptones apportent les éléments nutritifs. Du cristal violet est incorporé pour inhiber les bactéries Gram positives, en particulier les entérocoques et les staphylocoques. Les microorganismes entériques sont différenciés par l'association du lactose et de l'indicateur de pH au rouge neutre. Les colonies sont incolores ou de couleur rose à rouge, selon la capacité de l'isolat à fermenter ou non les glucides.³⁻⁵

En 1966, Ellner et al. ont signalé le développement d'une préparation de gélose au sang désignée sous l'appellation « gélose Columbia ». ⁶ Ce milieu, qui favorise l'apparition de colonies plus importantes et en plus grand nombre que les bases de gélose au sang comparables, est utilisé dans les environnements qui nécessitent des milieux contenant du sang et des préparations sélectives. Ellner et al. ont découvert qu'un milieu contenant 10 mg de colistine et 15 mg d'acide nalidixique par litre dans une base de gélose Columbia enrichie avec 5 % de sang de mouton favorise la croissance de staphylocoques, de streptocoques hémolytiques et d'entérocoques, tout en inhibant la croissance de *Proteus*, *Klebsiella* et des *Pseudomonas* spp.⁶ La résistance des bactéries aux agents antimicrobiens s'est accrue au fil des ans. Ceci est particulièrement vrai pour les bacilles Gram négatifs qui devraient être inhibés, mais croissent souvent sur la gélose Columbia ANC avec 5 % de sang de mouton. Dans la Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (gélose Columbia ANC avec 5 % de sang de mouton, Améliorée II), une petite quantité d'aztréonam a été ajoutée afin de maintenir la spécificité de ce milieu, et la concentration en acide nalidixique a été réduite à 5,5 mg/l afin d'accroître la mise en évidence des cocci à Gram positif, en particulier des staphylocoques. La concentration de colistine reste inchangée. L'aztréonam est une monobactamine qui n'agit que contre la plupart des bactéries Gram négatives et est inefficace contre les organismes Gram positifs.⁷⁻⁹

Le sang de mouton permet de détecter les réactions hémolytiques, particulièrement importantes dans le diagnostic présomptif des streptocoques.¹⁰

Par rapport à la Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood, la Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood a l'avantage d'améliorer la croissance des staphylocoques qui sont souvent mis en évidence après 18 à 24 heures d'incubation et de mieux inhiber les bactéries Gram négatives résistantes, en particulier *Proteus* spp.

La combinaison de ces deux milieux dans une boîte de pétri à deux compartiments (**BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood** (gélose MacConkey II/gélose Columbia ANC Améliorée II avec 5 % de sang de mouton)) sert à

l'isolement sélectif des bactéries Gram négatives et Gram positives à partir d'échantillons cliniques.

REACTIFS

BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate)

Formules* par litre d'eau purifiée

MacConkey II Agar		Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood	
Digestion pancréatique de gélatine	17,0 g	Peptones	20,0 g
Digestion pancréatique de caséine	1,5	Extrait de levure	3,5
Digestion peptique de tissu animal	1,5	Digestion trypsique de cœur de bœuf	3,0
Lactose	10,0	Amidon de maïs	1,0
Sels biliaires	1,5	Chlorure de sodium	5,0
Chlorure de sodium	5,0	Colistine	10,0 mg
Rouge neutre	0,03	Acide nalidixique	5,5
Cristal violet	0,001	Aztréonam	3,0
Gélose	13,5	Sang de mouton, défibriné	5 %
pH 7,1 ± 0,2		pH 7,3 ± 0,2	

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

PRECAUTIONS

IVD . A usage professionnel uniquement. ②

Ne pas utiliser de boîte de Pétri présentant des signes de contamination microbienne, de décoloration, de dessiccation, de fissure ou d'autres signes de détérioration.

Consulter le document **MODE D'EMPLOI GENERAL** pour plus d'informations concernant les protocoles de manipulation aseptique, les risques biologiques et l'élimination des produits usagés.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les boîtes de Pétri à l'obscurité entre 2 et 8 °C, dans leur emballage d'origine, jusqu'au moment de leur utilisation. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Les boîtes peuvent être ensemencées jusqu'à la date de péremption indiquée (voir l'étiquette de l'emballage) et incubées pendant les durées recommandées.

Les boîtes provenant de piles de 10 peuvent être utilisées pendant une semaine, dans la mesure où elles sont conservées dans un endroit propre entre 2 et 8 °C.

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Ensemencer des échantillons représentatifs avec les souches suivantes (pour plus d'informations, voir le document **MODE D'EMPLOI GENERAL**). Incuber en conditions aérobies les boîtes de Pétri, de préférence retournées, entre 35 et 37 °C, pendant 18 à 24 h.

Souches	MacConkey II Agar	Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Croissance bonne à excellente ; colonies de couleur rose à rouge avec des précipités biliaires	Inhibition complète
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Croissance bonne à excellente ; colonies de couleur beige tirant sur le marron, essaimage inhibé	Inhibition complète
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inhibition (partielle à) complète	Croissance bonne à excellente ; petites colonies grises
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inhibition complète	Colonies blanches tirant sur le jaune avec bêta-hémolyse
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Non testée	Petites colonies tirant sur le gris ; bêta-hémolyse
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Non testée	Petites colonies vertes à grises ; alpha-hémolyse
Sans ensemencement	Couleur rose clair, légèrement opalescente	Rouge, opaque

METHODE

Matériaux fournis

BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (boîtes de Pétri **Stacker** de 90 mm à deux compartiments). Produits contrôlés microbiologiquement.

Matériaux non fournis

Milieux de culture auxiliaires, réactifs et matériel de laboratoire requis.

Types d'échantillons

Les milieux contenus dans cette boîte de Pétri à deux compartiments sont utilisés pour l'isolement sélectif de nombreuses bactéries Gram négatives et Gram positives provenant de tous les types d'échantillons cliniques (voir aussi **CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE**).

Mode opératoire du test

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 une flore mixte.

Pour ensemercer la boîte de Pétri à deux compartiments avec des écouvillonnages, rouler d'abord l'écouvillon sur une petite portion de la Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood, puis le rouler sur une petite portion de la MacConkey II Agar. Strier à partir des zonesensemencées afin de créer l'isolement, en prenant soin d'utiliser une anse différente pour chacun des milieux. Incuber à l'air ambiant pendant 24 à 48 h, à une température comprise entre 35 et 37 °C. Il n'est pas conseillé d'incuber ce produit en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone car les résultats sur la MacConkey Agar risquent d'être différents de ceux obtenus avec une incubation à l'air ambiant.¹¹

Etant donné que des microorganismes Gram positifs et Gram négatifs sont inhibés sur ces deux milieux ou ne se développent pas à l'air ambiant, il convient d'inclure une boîte de Pétri contenant une gélose au sang non sélective, par ex. une **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** et de l'incuber pendant 24 à 48 heures à une température comprise entre 35 et 37 °C, dans une atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone.

Résultats

En général, la croissance obtenue sur **BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate)** est telle qu'indiqué ci-dessous :

Microorganismes	MacConkey II Agar	Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood
<i>E. coli</i>	Couleur rose à rose-rouge (colonies parfois cernées par une zone de précipitation biliaire)	Inhibition (partielle à) complète
<i>Enterobacter</i>	Aspect muqueux, colonies de couleur rose	Inhibition (partielle à) complète
<i>Klebsiella</i>	Aspect muqueux, colonies de couleur rose	Inhibition (partielle à) complète
<i>Proteus</i>	Colonies incolores, essaimage inhibé	Inhibition (partielle à) complète ; essaimage inhibé
<i>Salmonella</i>	Colonies incolores	Inhibition complète
<i>Shigella</i>	Colonies incolores	Inhibition complète
<i>Pseudomonas</i>	Colonies irrégulières, incolores à roses	Inhibition (partielle à) complète
Staphylocoques	Inhibition partielle à complète	Croissance ; colonies de taille petite à moyenne, de couleur blanche à jaune, avec ou sans bêta-hémolyse
Streptocoques	Inhibition complète	Croissance ; colonies de taille minuscule à moyenne, avec ou sans alpha/bêta-hémolyse
Entérocoques	Inhibition partielle à complète	Croissance ; colonies de taille minuscule à moyenne, parfois cernées de gris ; généralement non hémolytiques

D'autres bactéries Gram négatives et Gram positives, non énumérées dans la liste ci-dessus, peuvent également se développer sur ces milieux. Pour plus d'informations sur ces développements, et pour en interpréter les données, consulter les documents cités en référence.^{4,10,12}

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

La **BD MacConkey II Agar** figure parmi les milieux utilisés en standard pour l'ensemencement primaire d'échantillons cliniques et de nombreuses matières non cliniques. Tous les organismes de la famille des *Enterobacteriaceae* et plusieurs autres bacilles Gram négatifs, par exemple *Pseudomonas* et autres genres apparentés, se développent sur ce milieu. Les non fermentants ou autres bacilles Gram négatifs sensibles aux composants sélectifs de ce milieu ne se développent pas. Avant d'utiliser ce milieu pour des organismes spécifiques, consulter les chapitres correspondants dans les documents de référence.^{4,10,12}

La **BD Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood** est un milieu amélioré sélectif servant à l'isolement et à la culture de nombreux microorganismes Gram positifs qui se développent en conditions aérobies, par ex. les streptocoques, staphylocoques, *Listeria* spp. et d'autres, issus d'échantillons cliniques. Ce milieu assure une détection plus rapide des staphylocoques, entérocoques et streptocoques, ainsi qu'une meilleure inhibition des bactéries Gram négatives que la Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood.

Dans les évaluations internes des performances, la croissance de 38 souches (isolats cliniques et souches prélevées) de bactéries Gram positives appartenant aux espèces citées dans le tableau 1 et celle de nombreuses bactéries Gram négatives ont été testées sur les géloses **BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate) en boîte de Pétri à deux compartiments. Une gélose BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood (=COL)** a servi de milieu de référence pour la croissance. Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 18 à 24 h entre 35 et 37 °C, en atmosphère aérobie.

Les souches de *Proteus* résistantes aux quinolones ont été complètement inhibées sur Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood mais ont donné une croissance très importante sur les géloses MacConkey II et Columbia.

La taille des colonies et les zones hémolytiques sur Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood étaient comparables à celles obtenues sur gélose Columbia. Toutes les souches Gram positives à l'exception de *Corynebacterium diphtheriae* se sont développées sur Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood en 18 à 20 heures d'incubation aérobie et étaient complètement inhibées sur MacConkey II Agar. *C. diphtheriae* a nécessité 42 heures d'incubation. Les tests incluaient des staphylocoques requérant 2 jours d'incubation sur gélose Columbia CNA standard.

Tableau 1 : Espèces Gram positives testées et mises en évidence sur BD Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (incubation aérobie)

<i>Corynebacterium diphtheriae</i> *	<i>Staphylococcus hyicus</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Streptococcus</i> du groupe C
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	<i>Streptococcus</i> du groupe G
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>	
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	
<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	
<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	

* 48 heures d'incubation requises pour la mise en évidence sur **CNA-II** et **CNA**.

Limites de la procédure : les bactéries Gram négatives qui résistent aux ingrédients sélectifs peuvent se développer dans ce milieu.

Les espèces de *Candida* et les autres champignons ne sont pas inhibés sur ce milieu.

Bien qu'il s'agisse de bactéries Gram positives, les aérobies sporulés tels que *Bacillus* spp. peuvent être inhibés sur la Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood. Les corynébactéries peuvent nécessiter 42 à 48 heures d'incubation sur la Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood.

Certains streptocoques, par ex. *Streptococcus intermedius* et *Streptococcus milleri* nécessitent une atmosphère anaérobie ou enrichie en CO₂ afin de se développer.

La base de gélose Columbia possède une teneur relativement élevée en glucides. Par conséquent, les streptocoques bêta-hémolytiques peuvent produire une réaction hémolytique de couleur verdâtre susceptible d'être confondue avec une alpha-hémolyse sur Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood.

Même si de nombreuses bactéries Gram négatives et Gram positives se développent sur l'un des milieux contenus dans la **BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate)**, il convient d'inclure un milieu non sélectif pour l'isolement primaire de tous les pathogènes susceptibles d'être présents dans l'échantillon.¹⁰ Le **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** est un milieu de mise en culture primaire non sélectif fréquemment utilisé qui peut être employé à cette fin. Pour l'isolement des microorganismes exigeants, tels que *Neisseria* ou *Haemophilus*, il convient d'ensemencer également une boîte de gélose au chocolat, par ex. une **BD Chocolate Agar (GC II Agar with IsoVitaleX)** avec l'échantillon, si la présence de ces microorganismes est présumée.

Il a été signalé que certains *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonas aeruginosa* sont inhibés sur MacConkey Agar lorsqu'ils sont incubés dans une atmosphère enrichie en CO₂.¹¹ Par conséquent il ne faut pas incuber **BD MacConkey II Agar / Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate)** dans une atmosphère enrichie en CO₂.

Sur certaines boîtes de Pétri présentant une forte croissance des staphylocoques sur Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood mais aucune croissance sur MacConkey II Agar, une décoloration du milieu MacConkey II Agar a également été observée. Celle-ci n'a aucun effet négatif sur la mise en évidence et la coloration typique des colonies de bactéries Gram négatives sur MacConkey II Agar.

Il est certes possible de procéder à divers tests diagnostiques directement dans ces milieux mais, pour obtenir une identification complète des isolats, il convient d'employer des tests biochimiques et, si nécessaire, des tests immunologiques faisant appel à des cultures pures.

REFERENCES

1. Levine, M., and H.W. Schoenlein. 1930. A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
2. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
3. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
4. Farmer, J.J., III., K.D. Boatwright, and J.M. Janda 2007. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: Murray, P. R., E. J. Baron, M.L. Landry, J.H. Jorgensen, and M. A. Pfaller (ed.). Manual of clinical microbiology, 9thed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Downes, F.P., and K. Ito. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th edition. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C. USA.
6. Ellner, P.D., C.J. Stoessel, E. Drakeford, and F. Vasi. 1966. A new culture medium for medical bacteriology. Am. J. Clin. Pathol. 45: 502-504.
7. Wood, W., G. Harvey, E.S. Olson, and T.M. Reid. 1993. Aztreonam selective agar for Gram positive bacteria. J. Clin. Pathol. 46: 769-771.
8. Wiedemann, B., and B. A. Atkinson. 1986. Susceptibility to antibiotics: species incidence and trends. In: Lorian, V. (ed.), Antibiotics in Laboratory medicine, p. 962-1208. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
9. von Graevenitz, A. 1986. Use of antimicrobial agents as tools in epidemiology, identification, and selection of microorganisms. In: Lorian, V. (ed.), Antibiotics in Laboratory medicine, p. 723-738. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

10. Spellerberg, B., Brandt, C. 2007. *Streptococcus*. In: Murray, P. R., E. J. Baron, M.L. Landry, J.H. Jorgensen, and M. A. Pfaller (ed.). Manual of clinical microbiology, 9thed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Mazura-Reetz, G. T. Neblett, and J. M. Galperin. 1979. MacConkey Agar: CO₂ vs. ambient incubation. Abst. Ann. Mtg. American Society for Microbiology. C179.
12. Isenberg, H. D. (ed.). 1992. Interpretation of aerobic bacterial growth on primary culture media, Clinical microbiology procedures handbook, vol.1, p. 1.6.1-1.6.7. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

CONDITIONNEMENT

BD MacConkey II Agar / BD Columbia CNA Agar Improved II with 5% Sheep Blood (Biplate)

N° réf.	Description
REF 257574	Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 20 unités par carton
REF 257584	Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 120 unités par carton

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Pour plus d'informations, contacter le représentant local de BD.



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>

<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

ATCC est une marque de commerce de l'American Type Culture Collection.

BD, le logo BD et Stacker sont des marques de commerce de Becton, Dickinson and Company.

© 2015 Becton, Dickinson and Company