

BD Mac Conkey II Agar / Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood (Biplate)

APPLICATION

La **BD Mac Conkey II Agar / Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood (Biplate)** (gélose Mac Conkey II/gélose CNA de Columbia avec 5 % de sang de mouton en boîte de Pétri à deux compartiments) est utilisée 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 MacConkey Agar 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.^{1,2} Par la suite, ce milieu a été modifié à diverses reprises.^{3,4}

La MacConkey Agar n'est que légèrement sélective car la concentration de sels biliaires, inhibiteurs de microorganismes Gram positifs, est faible par rapport à d'autres milieux de mise en culture entériques. Ce milieu est recommandé pour les échantillons cliniques susceptibles de contenir un mélange de flores microbiennes, tels que les échantillons d'urine, respiratoires, ceux prélevés sur des plaies, etc. car il autorise un groupement préliminaire des bactéries entériques et d'autres bactéries Gram négatives dans les fermentants et non fermentants du lactose.^{4,6} La MacConkey Agar est également employée dans l'examen microbiologique des denrées alimentaires.⁷

La MacConkey II Agar a été formulée en 1987 afin de mieux inhiber l'essaimage des *Proteus* spp., afin d'obtenir une différenciation plus nette des fermentants et non fermentants du lactose et pour stimuler la croissance des bactéries entériques. Dans la MacConkey II Agar, 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, suivant la capacité de l'isolat à fermenter le glucide.⁴

En 1966, Ellner *et al.* ont signalé le développement d'une préparation de gélose au sang désignée sous l'appellation « Columbia Agar ». ⁸ Ce milieu, qui favorise l'apparition de colonies de plus grande taille, permet une croissance plus luxuriante que les bases de gélose au sang comparables. Il 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.^{8,9}

La Columbia Agar constitue un milieu de base très nutritif. L'ajout d'agents antimicrobiens, de colistine et d'acide nalidixique rend le milieu sélectif pour les microorganismes Gram positifs, en particulier les streptocoques et les staphylocoques. Le sang de mouton permet de détecter les réactions hémolytiques.^{4,5,9}

L'association de ces deux milieux sur une même boîte de Pétri divisée en deux compartiments est utilisée pour l'isolement sélectif des bactéries Gram négatives et Gram positives à partir d'échantillons cliniques.

REACTIFS

BD Mac Conkey II Agar / Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood (Biplate)

Formules* par litre d'eau purifiée :

MacConkey II Agar		Columbia CNA Agar 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	Fécule de maïs	1,0
Sels biliaires	1,5	Chlorure de sodium	5,0
Chlorure de sodium	5,0	Colistine	0,01
Rouge neutre	0,03	Acide nalidixique	0,015
Cristal violet	0,001	Gélose	15,0
Gélose	13,5	Sang de mouton défibriné	5 %
pH 7,1 ± 0,2		pH 7,3 ± 0,2	

*Ajustées et/ou complémentées en fonction des critères de performances imposés.

PRECAUTIONS

IVD . A usage professionnel uniquement.

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

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

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les boîtes de Pétri dans 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 êtreensemencées jusqu'à la date de péremption indiquée (voir l'étiquette de l'emballage), et incubées pendant les durées recommandées.

Des boîtes provenant d'une pile ouverte de 10 boîtes sont utilisables pour une semaine lorsqu'elles sont conservées entre +2 et +8 °C dans un endroit propre.

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Ensemencer des échantillons représentatifs avec les souches suivantes (pour plus de détails, voir le document **MODE D'EMPLOI GENERAL**). Incuber en conditions aérobie pendant 24 h, entre 35 et 37 °C.

Souches	MacConkey II Agar	Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Croissance bonne à importante ; 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 partielle à complète, essaimage inhibé
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	Croissance bonne à excellente ; colonies beiges	Non testée
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Croissance bonne à excellente ; colonies beiges	Non testée
<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 (couleur sang)

MÉTHODE

Matériaux fournis

BD Mac Conkey II Agar / Columbia CNA Agar 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 issues de tous les types d'échantillons cliniques (voir aussi **CARACTERISTIQUES DES PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE**).¹⁰

Mode opératoire du test

Strier les échantillons sans attendre, dès leur arrivée au laboratoire. La méthode de la striation des milieux en boîte de Pétri sert essentiellement 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 l'écouvillon sur une petite portion de la Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood, puis le rouler sur une petite portion de 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 35 ± 2 °C. Il n'est pas conseillé d'incuber la MacConkey Agar en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone.¹¹

Etant donné que des microorganismes Gram positifs et Gram négatifs sont inhibés sur ces deux milieux, il convient d'inclure une boîte de Pétri contenant une gélose au sang non sélective, p. ex. une **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** âgée de 24 à 48 h et incubée à 35 ± 2 °C dans une atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone.

Résultats

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

Microorganismes	Mac Conkey II Agar	Columbia CNA Agar 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 partielle à complète
<i>Shigella</i>	Colonies incolores	Inhibition partielle à 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 les croissances, et pour en interpréter les données, consulter les documents cités en référence.^{5,9} Pour obtenir une identification complète, il convient d'employer des tests biochimiques et, si nécessaire, des tests immunologiques faisant appel à des cultures pures.^{5,6,9}

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

La MacConkey II Agar figure parmi les milieux standards utilisés pour l'ensemencement primaire d'échantillons cliniques et pour de nombreuses matières non cliniques. Ce milieu favorise le développement de tous les microorganismes de la famille des *Enterobacteriaceae* ainsi que de nombreux autres bâtonnets Gram négatifs, p. ex. les *Pseudomonas* et les genres associés.^{5-7,9}

Les non-fermentants ou les autres bâtonnets Gram négatifs sensibles à ces composants sélectifs ne se développent pas dans ce milieu. Avant d'utiliser ce milieu pour des microorganismes spécifiques, consulter les chapitres correspondants des documents cités en référence.^{5,9,10}

Il a été rapporté que des *Enterobacteriaceae* et des *Pseudomonas aeruginosa* sont inhibées sur la MacConkey Agar lorsque celle-ci est incubée dans une atmosphère enrichie en CO₂.¹¹

La Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood est un milieu standard servant à l'isolement et à la culture de nombreux microorganismes Gram positifs qui se développent en conditions aérobie, p. ex. les streptocoques, staphylocoques, coryneformes, *Listeria* spp. et d'autres.^{5,9} Les bactéries Gram négatives qui résistent aux ingrédients sélectifs peuvent se développer dans ce milieu.

Les *Candida* spp. et les autres champignons ne sont pas inhibés dans ce milieu.

Bien que ce soient des bactéries Gram positives, les aérobies sporulés tels que *Bacillus* spp. peuvent être inhibés sur la Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood.

Il faut noter que ce milieu possède une teneur en glucide relativement élevée. Par conséquent, il est possible que les streptocoques bêta-hémolytiques produisent une réaction hémolytique de couleur tirant sur le vert, susceptible d'être confondue avec une alpha-hémolyse.

Même si de nombreuses bactéries Gram négatives et Gram positives se développent sur l'un des milieux contenus dans la **BD Mac Conkey II Agar / Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood (Biplate)**, il convient d'inclure un milieu non sélectif pour l'isolement primaire de la totalité des pathogènes susceptibles d'être présents dans l'échantillon.¹⁰ La **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** est un milieu de mise en culture 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, p. ex. une **BD Chocolate Agar (GC II Agar with IsoVitaléX)** avec l'échantillon, si la présence de ces microorganismes est présumée.

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. MacConkey, A.T. 1900. Note on a new medium for the growth and differentiation of the *Bacillus coli communis* and the *Bacillus typhi abdominalis*. The Lancet, Part II:20.
2. MacConkey, A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in faeces. J. Hyg. 5:333-379.
3. Levine, M., and H.W. Schoenlein. 1930. A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
4. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
5. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
6. Farmer, J.J., III. 2003. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

7. 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.
 8. 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.
 9. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 10. Thomson, R.B., and J.M. Miller. 2003. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. *In*: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Mazura-Reetz, G. T. Neblett, and J. M. Galperin. 1979. MacConkey Agar: CO₂ vs. ambient incubation. *Abst. Ann. Mtg. American Society for Microbiology.* C179.

CONDITIONNEMENT

BD Mac Conkey II Agar / BD Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood (Biplate)

N° réf. 254447 Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 20 unités par carton

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

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



BD Diagnostic Systems

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

BD Diagnostic Systems Europe

Becton Dickinson France SA

11 rue Aristide Bergès

38800 Le Pont de Claix/France

Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 <http://www.bd.com>

BD, BD logo and Stacker are trademarks of Becton, Dickinson and Company.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

© 2003 Becton, Dickinson and Company