



BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate)

APPLICATION

Le **BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate)** (milieu d'orientation CHROMagar / gélose Columbia CNA en boîte de Pétri à deux compartiments) est utilisé pour l'isolement des bactéries fréquemment impliquées dans les infections des voies urinaires. Le **CHROMagar Orientation Medium** est un milieu non sélectif utilisé pour l'isolement, l'identification ou la différenciation des pathogènes des voies urinaires, tandis que la Columbia CNA Agar est un milieu sélectif servant à l'isolement des bactéries à Gram positif.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.

CHROMagar Orientation Medium : Les *Escherichia coli*, les entérocoques, le groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* et le groupe *Proteus-Morganella-Providencia* sont les microorganismes qui sont le plus souvent responsables des infections urinaires. Soixante à 70 % des infections urinaires sont causées par des *E. coli* en culture pure ou associés à des entérocoques. Bien que plus rarement, les *Staphylococcus saprophyticus* et les *Streptococcus agalactiae* peuvent être à l'origine des infections urinaires chez la femme.

Certains des microorganismes impliqués produisent des enzymes soit pour le métabolisme du lactose, soit pour celui des glucosides, soit pour les deux, tandis que d'autres ne produisent aucune de ces enzymes. *E. coli*, par exemple, produit des enzymes pour le métabolisme du lactose, et donne une réponse négative à la β -glucosidase. D'autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae* sont positifs à la β -glucosidase, mais ne contiennent pas les enzymes nécessaires à la fermentation du lactose. D'autres sont susceptibles de contenir les deux types d'enzyme, ou aucun. On trouve également des β -glucosidases dans les cocci à Gram positif tels que les *Enterococcus* spp. et *Streptococcus agalactiae*. La tryptophane désaminase (TDA) est une enzyme que l'on trouve généralement dans le groupe de microorganismes *Proteus-Morganella-Providencia*.

Le **CHROMagar Orientation Medium** permet d'identifier les *E. coli*, les entérocoques et la plupart des souches de *Staphylococcus saprophyticus* et de *S. simulans* directement sur la boîte de Pétri d'isolement ; de plus, la détection des groupes *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (=KES) et *Proteus-Morganella-Providencia* (=PMP) peut être effectuée par coloration des colonies et du milieu.¹⁻³ Le **CHROMagar Orientation Medium** étant non sélectif, d'autres agents pathogènes d'infections urinaires s'y développent, mais des tests biochimiques sont nécessaires pour les identifier.

BD Diagnostic Systems commercialise le **CHROMagar Orientation Medium**, développé par A. Rambach, dans le cadre d'un contrat de licence passé avec CHROMagar, Paris, France.

Dans le **CHROMagar Orientation Medium**, des peptones spécialement sélectionnées apportent les substances nutritives. Le mélange chromogène se compose de substrats artificiels (chromogènes), qui libèrent des composés de diverses couleurs lors de la dégradation causée par des enzymes microbiennes spécifiques, ce qui permet de différencier directement certaines espèces et de détecter certains groupes de microorganismes avec un nombre limité de tests de confirmation.

Columbia CNA Agar : Ellner *et al.* ont signalé le développement d'une formulation de gélose au sang désignée « Columbia Agar ». ⁴ Ce milieu, qui favorise l'apparition de colonies de plus grande taille et une croissance plus luxuriante que d'autres bases de gélose au sang comparables, est employé 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.⁴

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 à Gram positif, en particulier les streptocoques et les staphylocoques. Du sang de mouton est ajouté au milieu pour permettre la détection des réactions hémolytiques.^{4,5}

REACTIFS

BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate)

Formules approximatives* par litre d'eau purifiée

CHROMagar Orientation Medium	
Chromopeptones	16,1 g
Mélange chromogène	1,3
Gélose	15,0

pH 6,9 ± 0,2

Columbia CNA Agar			
Digestion pancréatique de caséine	12,0 g	Chlorure de sodium	5,0 g
Digestion peptique de tissu animal	5,0	Gélose	13,5
Extrait de levure	3,0	Colistine	0,01
Extrait de bœuf	3,0	Acide nalidixique	0,015
Fécule de maïs	1,0	Sang de mouton défibriné	5 %

pH 7,3 ± 0,2

*Ajustées et/ou complétées 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.

Les boîtes provenant de piles de 10 peuvent être utilisées pendant une semaine, dans la mesure où elles sont conservées dans un lieu propre entre 2 et 8 °C. Maintenir à l'abri de la lumière avant et pendant l'incubation, car toute exposition à la lumière détruirait les chromogènes du CHROMagar Orientation Medium.

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 les boîtes de Pétri en conditions aérobies entre 35 et 37 °C, pendant un minimum de 20 à 24 h.

Souches de test	CHROMagar Orientation Medium	Columbia CNA Agar
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Croissance bonne à importante ; colonies de petite taille, bleu-vert à bleues	Croissance bonne à importante ; colonies grises ; sans hémolyse
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	Croissance moyenne à bonne ; colonies minuscules, bleues	Croissance moyenne à importante ; colonies blanches à grises ; bêta-hémolyse
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Croissance bonne à importante ; colonies blanches à jaunâtres	Croissance bonne à importante, colonies blanchâtres ; bêta-hémolyse
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Croissance moyenne à importante ; colonies de taille moyenne, transparentes, roses	Inhibition complète
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27736	Croissance bonne à importante ; colonies de taille moyenne, bleu foncé, avec ou sans auréole bleue	Inhibition partielle à complète
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	Croissance moyenne à importante ; colonies bleu-vert ; milieu environnant ambre à marron	Inhibition partielle à complète
Sans ensemencement	Incolores à très légèrement ambrées, transparentes (peuvent contenir une quantité modérée de petites particules)	Rouge (couleur sang)

METHODE

Matériaux fournis

BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (boîtes de Pétri **Stacker** de 90 mm divisées en deux compartiments). Produits contrôlés microbiologiquement.

Matériaux non fournis

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

Types d'échantillons

Le **BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar** est utilisé exclusivement pour l'isolement, l'énumération et la différenciation des bactéries dans l'urine. L'urine provenant du jet urinaire principal, d'un cathéter ou celle prélevée lors d'une ponction vésicale sus-pubienne peut être utilisée (voir aussi **CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE**). Prélever les échantillons d'urine en observant les techniques d'asepsie. L'urine doit être soit directement striée sur le milieu au plus tard 2 h après le prélèvement, soit conservée au réfrigérateur (24 h au maximum) afin d'éviter une croissance excessive des agents infectieux ou des contaminants avant l'ensemencement sur ce milieu.⁶⁻⁸

Mode opératoire du test

Prélever un échantillon d'urine non diluée et bien mélangée à l'aide d'un ensemencement à anse étalonné (0,01 ou 0,001 mL). Pour l'ensemencement des milieux en boîtes de Pétri à deux compartiments, il est préférable d'utiliser des anses de 0,001 mL (= 1 µL). Vérifier que l'ensemencement à anse est correctement chargé d'échantillon. Tout d'abord, ensemercer l'échantillon sur une petite zone de la surface du **CHROMagar Orientation Medium** ; ensemercer ensuite la zone restante du milieu. Ensuite, prélever un nouvel échantillon d'urine et procéder de la même manière pour la **Columbia CNA Agar**. Si des anses de 10 µL sont employées, il est recommandé de réaliser une pré-dilution au 1/10^{ème} de l'échantillon d'urine dans une solution physiologique salée stérile. Incuber en conditions aérobies la boîte ensemencée retournée, entre 35 et 37 °C, pendant 20 à 24 h. Il n'est pas recommandé d'incuber cette boîte à deux compartiments dans une atmosphère complétementée en dioxyde de carbone. **Maintenir à l'abri de la lumière pendant l'incubation car la lumière peut détruire les chromogènes du**

CHROMagar Orientation Medium. Elles peuvent être exposées à la lumière dès que les colonies ont développé leur couleur.

Pour obtenir des colonies isolées présentant des couleurs et des morphologies types, il est impératif d'ensemencer les échantillons d'urine à l'aide d'ensemencement à anse étalonnés ou d'autres techniques courantes.

Résultats

Après l'incubation, les milieux doivent présenter des colonies isolées dans les zones où l'inoculum a été correctement dilué. Utiliser le **schéma 1** pour l'identification ou la différenciation, et s'y référer pour les tests de confirmation complémentaires sur **CHROMagar Orientation Medium**. Les résultats peuvent être vérifiés par coloration de Gram et par examen au microscope.

Sur la Columbia CNA Agar, la croissance se produit si des bactéries à Gram positif sont présentes. Pour plus d'informations sur les croissances se développant sur ce milieu, et pour en interpréter les données, consulter les documents cités en référence.^{5,9}

Tests de confirmation

Pour le **CHROMagar Orientation Medium**, procéder aux tests de confirmation requis (**schéma 1**). Ne pas appliquer de réactif de détection, tel que réactif de l'indole DMACA ou d'autres, directement sur les colonies présentes dans ce milieu. Il convient plutôt de réaliser les tests sur un papier filtre, avec des échantillons de croissance issus des colonies correspondantes. Ne pas utiliser le réactif de l'indole de Kovac pour les colonies d'*E. coli*, car la couleur de ces colonies peut interférer avec la couleur rouge apparaissant en cas de test positif ; utiliser à la place le réactif de l'indole diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA). Si d'autres tests de confirmation ou systèmes d'identification biochimiques sont employés, respecter les instructions fournies avec ces tests ou systèmes.

Calcul et interprétation des résultats⁶⁻⁹

Compter le nombre de colonies (UFC) dans chacun des milieux. Si une anse de 0,001 mL a été utilisée, chaque colonie correspond à 1 000 UFC/mL d'urine.⁷

Urine provenant du jet urinaire principal et du cathéter : Selon les standards actuels, une densité $\geq 10^5$ UFC/mL dans un même isolat indique une infection, une densité $< 10^5$ UFC/mL indique une contamination urétrale ou vaginale, et une densité comprise entre 10^4 et 10^5 UFC/mL nécessite une nouvelle évaluation basée sur des données cliniques.

Les bactéries contaminantes apparaissent généralement en petit nombre, et la morphologie de leurs colonies peut varier.

Urine prélevée lors d'une ponction vésicale sus-pubienne : La vessie des individus non infectés étant stérile, toutes les UFC détectées révèlent une infection.

Dans ce milieu, les agents pathogènes des voies urinaires se développent généralement en grand nombre et se regroupent en colonies de morphologie et de couleur uniformes.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

Le **BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate)** est utilisé pour l'isolement, l'identification ou l'identification présomptive des bactéries fréquemment impliquées dans les infections des voies urinaires.

Le **CHROMagar Orientation Medium** est un milieu chromogène servant à l'identification directe, à la différenciation et à l'énumération des agents pathogènes des voies urinaires courants. Il permet d'isoler de nombreux microorganismes se développant en conditions aérobies, tels que les *Enterobacteriaceae*, les *Pseudomonas* et d'autres bâtonnets à Gram négatif non fermentants, les entérocoques, les staphylocoques et de nombreux autres, à partir d'échantillons d'urine.¹⁻³

Il autorise l'identification directe d'*Escherichia coli*, par observation de la couleur des colonies suivie d'une confirmation grâce au test de l'indole, et l'identification directe d'*Enterococcus* et de *Streptococcus agalactiae* par observation de la couleur des colonies, suivie d'une confirmation par un test PYR, ou par un test d'agglutination sérologique pour la détermination du groupe de Lancefield. D'autres microorganismes peuvent être identifiés, soit à l'aide de plusieurs tests de confirmation, soit par identification biochimique complète, selon l'espèce. *E. coli* et/ou les

entérocoques étant responsables de la majorité des infections des voies urinaires, l'utilisation de ce milieu réduit considérablement le temps et la charge de travail liés à l'ensemencement et à la lecture des résultats produits par les systèmes d'identification nécessairement associés aux milieux classiques utilisés pour l'isolement.

La Columbia CNA Agar est un milieu standard servant à l'isolement et à la culture de nombreux microorganismes à Gram positif qui se développent en conditions aérobies, p. ex. les streptocoques, staphylocoques, coryneformes, *Listeria* spp. et d'autres.^{5,7,9}

Résultats des performances^{2,10}

Deux évaluations de performances indépendantes ont été réalisées sur le **CHROMagar Orientation Medium**. Les deux ont révélé que le milieu chromogène détectait davantage de pathogènes que les milieux classiques utilisés pour comparaison. Les données de la première évaluation ont été publiées. Les résultats des deux évaluations sont présentés dans le document **MODE D'EMPLOI** relatif au **BD CHROMagar Orientation Medium** (n° réf. 254102).²

Limites de la procédure

CHROMagar Orientation Medium : Les colonies présentant leur couleur naturelle et ne réagissant pas avec les substrats chromogènes doivent encore être différenciées par des tests biochimiques ou sérologiques appropriés. Consulter les publications citées en référence.^{9,11}

Les bâtonnets à Gram négatif autres que ceux appartenant au groupe KES sont susceptibles de produire des colonies bleues de grande taille, et leur identification nécessite donc d'autres tests biochimiques.¹¹

Dans certains cas très rares, des *Listeria monocytogenes* ou d'autres *Listeria* spp. peuvent être présents dans l'urine (p. ex. après un avortement provoqué par ces agents). Les *Listeria* produisent de petites colonies bleues à bleu-vert, négatives au test PYR, semblables aux *Streptococcus agalactiae* (voir schéma 1). Il peut donc être utile de préparer une coloration de Gram de toutes les souches produisant, sur ce milieu, de petites colonies bleues à bleu-vert et négatives au test PYR. La présence de bâtonnets à Gram positif peut indiquer la présence de *Listeria* spp. Des tests biochimiques supplémentaires sont nécessaires pour confirmer la présence de ces agents.

Il peut arriver, très rarement, que des isolats d'*Aeromonas hydrophila* produisent des colonies roses. Celles-ci peuvent être différenciées des *E. coli* par un test d'oxydase (*Aeromonas* = positif ; *E. coli* = négatif).

Parfois, des staphylocoques à coagulase négative autres que les *S. saprophyticus*, p. ex. *S. simulans*, *S. xylosus* et *S. intermedius*, produisent des colonies rose clair à roses. Il est donc nécessaire d'effectuer d'autres tests (voir schéma 1) sur ces isolats.

Le **CHROMagar Orientation Medium** ne permet pas le développement de microorganismes exigeants tels que *Neisseria*, *Haemophilus* ou *Mycoplasma* spp.

L'utilisation de ce milieu pour des échantillons non cliniques ou cliniques autres que l'urine n'est pas validée.

Avant d'utiliser le **CHROMagar Orientation Medium** pour la première fois, il est recommandé de se familiariser avec l'aspect caractéristique de ces colonies à l'aide de souches définies, p. ex. celles citées sous **CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR**.

Columbia CNA Agar : Des bactéries résistantes aux ingrédients sélectifs peuvent se développer dans ce milieu.

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

Bien qu'il s'agisse de bactéries à Gram positif, les aérobies sporulés tels que *Bacillus* spp. peuvent être inhibés sur la Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood.

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

La base Columbia Agar présente une teneur en hydrates de carbone relativement élevée. Par conséquent, il est possible que les streptocoques bêta-hémolytiques y produisent une réaction hémolytique de couleur verdâtre, susceptible d'être confondue avec une alpha-hémolyse.

REFERENCES

1. Merlino, J., S. Siarakas, G. J. Robertson, G. R. Funnell, T. Gottlieb, and R. Bradbury. 1996. Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1788-1793.
2. Hengstler, K.A., R. Hammann, and A.-M. Fahr. 1997. Evaluation of BBL CHROMagar Orientation medium for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2773-2777.
3. Samra, Z., M. Heifetz, J. Talmor, E. Bain, and J. Bahar. 1998. Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 36: 990-994.
4. 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.
5. MacFaddin, J. F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, p. 269-275. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
6. Barry, A.L., P.B. Smith, and M. Turck. 1975. Cumitech 2, Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Coordinating ed., T.L. Gavan. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Forbes, B.A., and P.A. Granato. Processing specimens for bacteria. 1995. *In*: Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Clarridge, J.E., M.T. Pezzlo, and K.L. Vosti. 1987. Cumitech 2A, Laboratory diagnosis of urinary tract infections. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. 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.
10. Data on file. BD Diagnostic Systems Europe, Heidelberg, Germany.
11. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8thed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

CONDITIONNEMENT

BD CHROMagar Orientation Medium / Columbia CNA Agar (Biplate)

REF 254489

Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 20 unités par carton

REF 257727

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

69126 Heidelberg/Germany

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

Reception_Germany@bd.com

<http://www.bd.com>

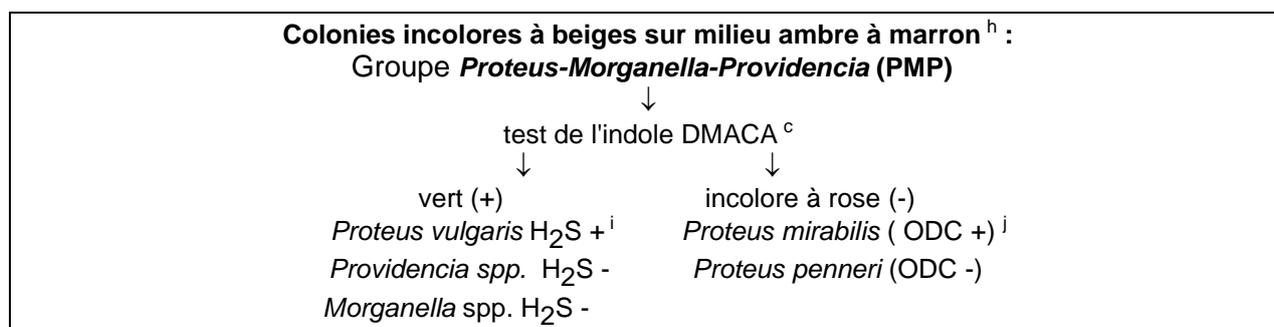
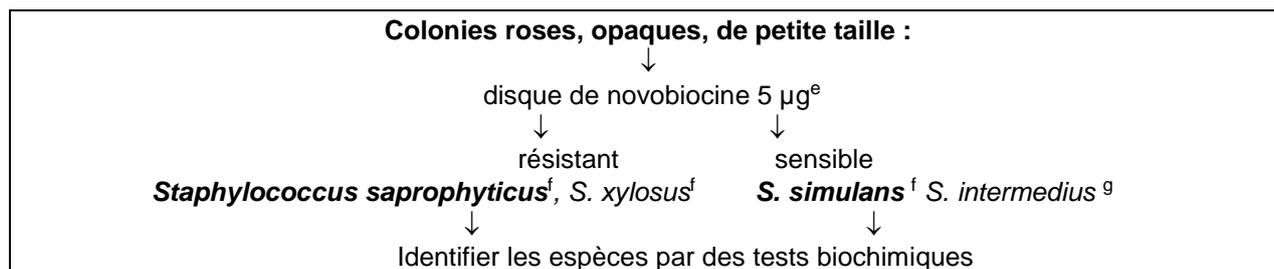
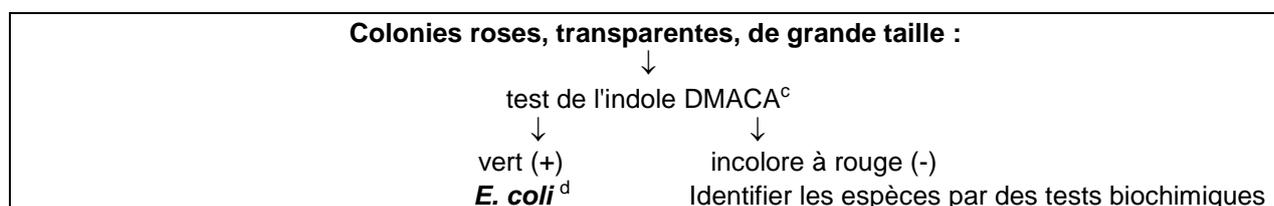
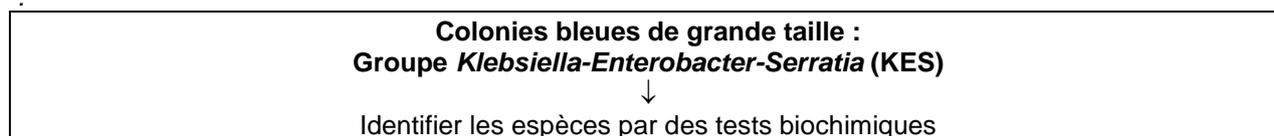
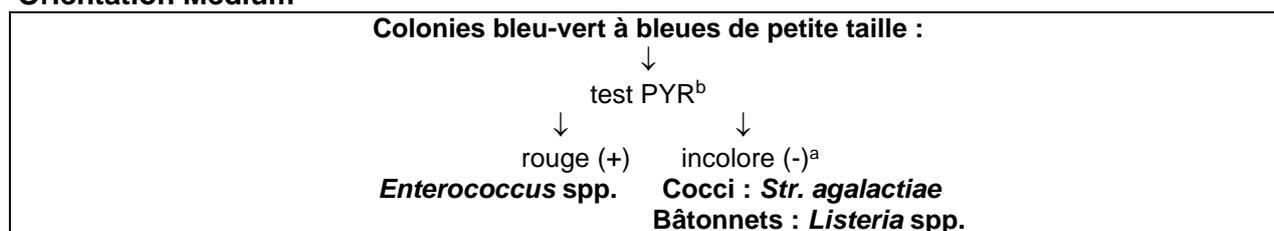
<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

© 2019 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Schéma 1 : Directives concernant l'aspect des colonies, l'exécution des tests de confirmation et la différenciation ou identification obtenue sur le BD CHROMagar Orientation Medium



^a Coloration de Gram recommandée.

^b Test au pyroglutamate pour pyrrolidonyl arylamidase. Il est possible d'utiliser des tests sérologiques pour le regroupement de Lancefield, au lieu d'un test PYR, pour différencier *Enterococcus* spp. de *Streptococcus agalactiae*.

^c DMACA= Réactif au diméthylaminocinnamaldéhyde pour la production d'indole. Appliquer le réactif sur du papier filtre et déposer par frottement une colonie, dans la zone du papier filtre où le réactif a été déposé. Attendre 10 à 20 sec. La couleur **verte** indique une production d'indole (rouge ou incolore = négatif). Ne pas utiliser le réactif de l'indole de Kovac pour tester les colonies roses !

^d Un test d'oxydase peut être réalisé sur toutes les colonies de grande taille positives à l'indole, afin d'exclure les *Aeromonas* (=oxydase positifs).

^e Ensemencer par étalement une boîte de Mueller Hinton II Agar avec l'isolat. Placer de la novobiocine (disque de 5 µg) sur la boîte ensemencée. Incuber pendant 18 à 24 h entre 35 et 37 °C, et mesurer la taille de la zone d'inhibition (résistance : ≤ 16 mm, sensibilité : > 16 mm).

^f Agents pathogènes connus chez l'humain. Peuvent aussi être isolés à partir de l'urine.

^g Pas d'isolement connu à partir de l'urine.

^h La couleur ambre à marron est due à la réaction positive à la tryptophane désaminase (TDA), commune à tous les microorganismes du groupe PMP. Environ 50 % des souches de *P. vulgaris* produisent des colonies bleues sur un milieu ambre à marron.

ⁱ Test à l'acide sulfhydrique classique.

^j Test à l'ornithine décarboxylase classique.