

## PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE

## I INTRODUCTION

La **BD BBL BCYE** (Buffered Charcoal Yeast Extract) Agar sert à isoler et à cultiver *Legionella* sp.

## II MODE OPERATOIRE DU TEST

1. Ensemencer des échantillons représentatifs avec les cultures répertoriées ci-dessous.
  - a. Ajouter 0,1 mL d'une culture contenant 30 à 300 UFC/0,1 mL à chaque boîte et ensemencer par étalement à l'aide d'un étaleur de verre stérile.
  - b. Incuber les boîtes à  $35 \pm 2$  °C en atmosphère aérobie.
  - c. Incuber les boîtes d'un lot de boîtes de **BD BBL BCYE Agar** et de **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** précédemment testées comme contrôles positif et négatif, respectivement.
2. Examiner les boîtes après 18 à 24 h et 48 à 72 h pour déceler une éventuelle croissance, l'apparition d'une pigmentation ou d'une fluorescence.
3. Résultats attendus

Souches de contrôle CLSI (souches ATCC)	ATCC	Récupération	La couleur de colonie / Fluorescence
* <i>Legionella pneumophila</i>	33152	Croissance à 72 h	Colonies blanches à grises, grises à gris-bleu.**
* <i>Fluoribacter (Legionella) bozemanii</i>	33217	Croissance à 72 h	Colonies blanches à grises, grises à gris-bleu ; fluorescence blanche et bleue sous lampe UV à grande longueur d'onde.
<i>Tatlockia (Legionella) micdadei</i>	33204	Croissance à 72 h	
<b>Souche supplémentaire utilisée</b>			
<i>Fluoribacter (Legionella) dumoffii</i>	33279	Croissance	Colonies blanches à grises, grises à gris-bleu. Fluorescence blanche et bleue sous lampe UV à grande longueur d'onde uniquement.

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

\*\* La norme M22-A3 du CLSI mentionne une « fluorescence jaune-verte sous lampe UV à grande longueur d'onde ». En fait, cette espèce n'est pas fluorescente.<sup>1,2</sup> Le sous-comité du CLSI a été avisé de cette divergence.

**REMARQUE :** Le CLSI M22-A3 fortement recommande que l'utilisateur effectue un test de Contrôle Qualité des milieux qui en sont exempts et qui sont utilisés pour les organismes exigeants tels que les *Legionella*.

## 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  $6,9 \pm 0,2$ .
4. Noter la fermeté des boîtes pendant l'ensemencement.
5. Incuber des boîtes représentatives non ensemencées à  $35 \pm 2$  °C et les examiner après 72 h pour déceler une contamination microbienne éventuelle.

## INFORMATIONS PRODUIT

## IV APPLICATION

La Buffered Charcoal Yeast Extract (**BD BBL BCYE**) Agar (gélose tamponnée à l'extrait de levure et au charbon actif) sert à l'isolement primaire et à la culture de *Legionella pneumophila* et d'autres espèces de *Legionella* à partir de prélèvements effectués sur site et d'échantillons cliniques.

## V RESUME ET EXPLICATION

La **BD BBL BCYE Agar** est basée sur une modification d'Edelstein de milieux précédemment décrits. En 1979, Feely *et al.* ont décrit la Charcoal Yeast Extract (CYE) Agar comme une modification d'un milieu existant, la gélose F-G.<sup>1,2</sup> Ils ont remplacé l'amidon de la gélose F-G par du charbon actif et l'hydrolysate de caséine par de l'extrait de levure pour améliorer la mise en évidence de *L. pneumophila*. En 1980, Pasculle a amélioré la CYE Agar en tamponnant le milieu avec du tampon ACES.<sup>3</sup> Une année plus tard, Edelstein a encore augmenté la sensibilité du milieu en y incorporant de l'alpha-cétoglutarate (BCYE Agar).<sup>4</sup>

## VI PRINCIPES DE LA METHODE

La **BD BBL BCYE Agar** est un milieu enrichi servant à isoler et à cultiver *Legionella* sp. L'extrait de levure apporte les protéines et les autres nutriments nécessaires à la croissance bactérienne. La L-cystéine, un acide aminé essentiel et le pyrophosphate ferrique soluble, un supplément ferrique, sont incorporés pour satisfaire les exigences nutritionnelles spécifiques de *Legionella* sp. L'alpha-cétoglutarate est ajouté pour stimuler la croissance. Le charbon actif décompose le peroxyde d'hydrogène, un produit métabolique toxique pour *Legionella* sp., et peut également capter le dioxyde de carbone et modifier la tension superficielle. Le tampon ACES incorporé maintient un pH optimal pour la croissance.

## VII REACTIFS

### BD BBL BCYE Agar

Formule approximative\* par litre d'eau purifiée

Extrait de levure .....	10,0 g	Charbon de bois activé .....	2,0 g
Chlorhydrate de L-cystéine .....	0,4 g	Alpha-cétoglutarate .....	1,0 g
Pyrophosphate ferrique .....	0,25 g	Gélose .....	15,0 g
Tampon ACES .....	10,0 g		

\*Ajustée et/ou complétée 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 »<sup>5-8</sup> 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 êtreensemencées 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

Différents écouvillons et récipients ont été conçus pour recueillir les échantillons. Prélever les échantillons avant l'administration d'agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire. Plusieurs milieux ou systèmes de transport, comme les produits de prélèvement et de transport des échantillons **BBL**, ont été conçus pour prolonger la survie des microorganismes lorsqu'un délai important sépare le prélèvement et la mise en culture effective des échantillons.

Consulter les publications citées en référence pour plus d'informations sur les méthodes de prélèvement et de préparation des échantillons.<sup>9,10</sup>

## IX METHODE

### Matériaux fournis

BD BBL BCYE Agar

### Matériaux requis mais non fournis

Milieux de culture auxiliaires, réactifs, souches de contrôle de qualité et matériel de laboratoire requis.

### Mode opératoire du test

Respecter les techniques d'asepsie.

### La surface de la gélose doit être lisse, ferme et humide, mais sans excès d'humidité.

Mettre l'échantillon en culture dès que possible après réception au laboratoire. Pour cultiver un échantillon prélevé par écouvillonnage, ensemercer le milieu en roulant l'écouvillon sur un tiers de la gélose, puis strier le reste de la gélose pour obtenir des colonies isolées. Cultiver les échantillons non recueillis par écouvillonnage en striant le milieu avec un ensemerceur à anse stérile. La technique en boîte d'étalement sert principalement à obtenir des colonies isolées à partir d'échantillons contenant des flores mixtes.

Incuber les boîtes retournées (le fond au-dessus) à 35 ± 2 °C pendant au moins 3 jours. Une croissance bactérienne est habituellement décelable en 3 à 4 jours, mais peut demander jusqu'à 2 semaines pour être visible.

### Contrôle de qualité par l'utilisateur

Chaque lot de milieu a été testé à l'aide des organismes de contrôle de qualité adaptés et ces tests sont conformes aux spécifications du produit, ainsi qu'aux normes CLSI, lorsqu'elles sont applicables. Comme toujours, les tests de CQ doivent être réalisés conformément aux réglementations locales, régionales, nationales ou internationales, aux exigences d'accréditation et/ou aux protocoles de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement.

## X RESULTATS

Après une incubation suffisante, on doit observer des colonies isolées dans les parties striées des boîtes et une croissance agglomérée dans les zones fortement ensemençées. *Legionella pneumophila* forme des colonies de petite à grande taille, lisse, incolore à pâle, de couleur gris-bleu et d'aspect légèrement muqueux. Consulter les publications citées en référence pour connaître, entre autres, le développement, la morphologie et la couleur de fluorescence des autres espèces sur ce milieu.<sup>11,12</sup>

Une coloration de Gram, ainsi que des tests biochimiques et sérologiques sont indispensables pour confirmer l'identification.

## XI LIMITES DE LA PROCEDURE

Certains tests diagnostiques peuvent être réalisés sur boîte d'isolement primaire. Cependant, une culture pure est recommandée pour réaliser des tests biochimiques et d'autres tests d'identification. Consulter les publications citées en référence pour plus d'informations sur les méthodes recommandées.<sup>11,13,14</sup>

## XII CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Les caractéristiques de performances de tous les lots de **BD BBL BCYE Agar** sont testées en usine. Des échantillons représentatifs du lot sont testés par étalement de suspensions de *Legionella*, diluées avec du sérum physiologique à une concentration finale de 30 à 300 UFC par boîte. Les boîtes sont incubées à 35 à 37 °C en atmosphère aérobie pendant trois jours. On observe une croissance modérée à importante. La couleur et la fluorescence des colonies sous lampe UV à grande longueur d'onde sont conformes.

## XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
221808	<b>BD BBL BCYE Agar</b>

## XIV REFERENCES

1. Feeley, J.C., R.J. Gibson, G.W. Gorman, N.C. Langford, J.K. Rasheed, D.C. Mackel, and W.B. Baine. 1979. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 10:437–441.
2. Feeley, J.C., G.W. Gorman, R.E. Weaver, D.C. Mackel, and H.W. Smith. 1978. Primary isolation media for Legionnaires' disease bacterium. J. Clin. Microbiol. 8:320–325.
3. Pasculle, A.W., J.C. Feeley, R.J. Gibson, L.G. Cordes, R.L. Myerowitz, C.M. Patton, G.W. Gorman, C.L. Carmack, J.W. Ezzell, and J.N. Dowling. 1980. Pittsburgh pneumonia agent: direct isolation from human lung tissue. J. Infect. Dis. 141:727–732.
4. Edelstein, P.H. 1981. Improved semi-selective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. J. Clin. Microbiol. 14:298–303.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Isenberg, H.D., F.D. Schoenknecht, and A. von Graevenitz. 1979. Cumitech 9, Collection and processing of bacteriological specimens. Coordinating ed., S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Miller, J.M. and H.T. Holmes. 1999. Specimen collection, transport, and storage, p.33–63. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Winn, W.C., Jr. 1999. *Legionella*, p. 572–585. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Weaver, R.E. 1978. Cultural and staining characteristics, p. 40–43. In G.L. Jones, and G.A. Herbert (ed.), "Legionnaires" the disease, the bacterium, and methodology. USDHEW, Center for Disease Control, Atlanta.
13. 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 Company, Philadelphia.
14. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.

Service et assistance technique : contacter votre représentant local de BD ou consulter le site [www.bd.com](http://www.bd.com).



Becton, Dickinson and Company  
7 Loveton Circle  
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited  
Pottery Road, Dun Laoghaire  
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.