

PROCEDURES DE CONTRÔLE DE QUALITÉ

I INTRODUCTION

La **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** (gélose de soja **BD BBL Trypticase** complétée de 5 % de sang de mouton) favorise la croissance des microorganismes exigeants et la visualisation des réactions hémolytiques. La **BD BBL MacConkey II Agar with MUG** (gélose **BD BBL MacConkey II** avec MUG) sert à l'identification présomptive d'*Escherichia coli*.

II MODE OPERATOIRE DU TEST

A. BD BBL 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 0,1 mL d'une dilution contenant 30 à 300 UFC sur chaque boîte de Pétri ; l'ensemencer par étalement à l'aide d'un râteau en verre stérile.
 - b. Incuber les souches de *Staphylococcus* et d'*Escherichia* à 35 ± 2 °C en atmosphère aérobie et les souches de *Streptococcus* à 35 ± 2 °C en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone.
2. Examiner les boîtes au bout de 18 à 24 h afin de contrôler la croissance, la taille des colonies et les réactions hémolytiques.
3. Résultats attendus

Souches de contrôle CLSI	Couches ATCC	Récupération
* <i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	Croissance, bêta-hémolyse
* <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Croissance, alpha-hémolyse
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Croissance
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Croissance

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

B. BD BBL MacConkey II Agar with MUG

1. Ensemencer des échantillons représentatifs avec des dilutions des cultures répertoriées ci-dessous.
 - a. Strier les boîtes servant à l'isolement à l'aide de cultures en bouillon diluées au 1/10 et âgées de 18 à 24 h. Pour *Proteus mirabilis*, réaliser deux dilutions sériées supplémentaires au 1/10 avant de strier les boîtes.
 - b. Incuber les boîtes à 35 ± 2 °C en atmosphère aérobie.
 - c. Incorporer des boîtes de **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** pour qu'elles jouent le rôle de contrôles non sélectifs pour l'ensemble des microorganismes.
2. Examiner les boîtes au bout de 18 à 48 h afin de mesurer la croissance, la fluorescence, la pigmentation et la sélectivité.
3. Résultats attendus

Microorganismes	ATCC	Récupération	Couleur de la colonie	Fluorescence
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Croissance	Colonies de couleur rose-rouge	+
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Croissance	Colonies incolores, inhibition de l'essaimage	-
* <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérotype Typhimurium	14028	Croissance	Colonies incolores	-
* <i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Inhibition (partielle à complète)	N/A	-

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

III CONTRÔLE DE QUALITÉ SUPPLÉMENTAIRE

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 (TSA II) et 7,1 ± 0,2 (**BD BBL MacConkey II Agar with MUG**).
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 **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** favorise la croissance des microorganismes exigeants et la visualisation des réactions hémolytiques produites par de nombreuses espèces bactériennes.

La **BD BBL MacConkey II Agar with MUG** (gélose **BD BBL MacConkey II** avec MUG) sert à l'identification présomptive d'*Escherichia coli*.

V RÉSUMÉ ET EXPLICATION

A. BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

Les qualités nutritionnelles de la **BD Trypticase Soy Agar** en ont fait un milieu très employé, à la fois comme produit non complétement et comme base de milieux au sang. La **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** est largement utilisée pour mettre en évidence et cultiver des espèces microbiennes exigeantes, ainsi que pour visualiser des réactions hémolytiques, qui constituent des critères importants de différenciation pour les bactéries, en particulier *Streptococcus* spp.

B. BD BBL MacConkey II Agar with MUG

Publiée en 1983, la formulation de la **BD BBL MacConkey II Agar** a été conçue pour renforcer l'inhibition de l'essaimage des espèces de *Proteus* afin de différencier plus résolument les fermentants des non fermentants du lactose et favoriser une meilleure croissance des pathogènes entériques.

Trepeta et Edberg¹ ont modifié la gélose de MacConkey en y incorporant du MUG (4-méthylumbelliféryl-β-D-glucuronide). Ainsi, les auteurs ont pu identifier *E. coli* de façon présomptive à partir du milieu d'étalement primaire en moins de 5 min.

VI PRINCIPES DE LA METHODE

A. BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

L'association de la caséine et des peptones de soja dans la base de **BD Trypticase Soy Agar** rend ce milieu hautement nutritif en fournissant une source d'azote organique, notamment par l'intermédiaire des acides aminés et des peptides à longue chaîne. Le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique du milieu.

Le sang de mouton défibriné est le type de sang le plus largement utilisé pour enrichir les milieux à base de gélose.² Les réactions hémolytiques des streptocoques sont caractéristiques. La croissance d'*Haemophilus haemolyticus*, une bactérie non pathogène dont les colonies hémolytiques sont impossibles à distinguer de celles des streptocoques bêta-hémolytiques, est inhibée.

La **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)** offre des conditions de croissance et de bêta-hémo lyse particulièrement favorables à *Streptococcus pyogenes* (groupe A de Lancefield). Ce milieu permet également d'obtenir une croissance importante et des réactions hémolytiques appropriées de la part d'autres microorganismes exigeants. Il peut être employé avec des disques de bacitracine (**BD Taxo A**) faiblement dosés (0,04 unité) pour l'identification présomptive des streptocoques du groupe A (*S. pyogenes*).

B. BD BBL MacConkey II Agar with MUG

La **BD BBL MacConkey II Agar** est un milieu sélectif et différentiel. Il est seulement légèrement sélectif car la concentration de sels biliaires, qui inhibent les microorganismes à Gram positif, est faible par comparaison avec d'autres milieux d'étalement entériques. Du cristal violet est également inclus dans le milieu pour inhiber la croissance des bactéries à Gram positif, notamment les entérocoques et les staphylocoques.

L'isolement des microorganismes entériques s'obtient par l'association du lactose et de l'indicateur rouge neutre. Les colonies sont incolores ou de couleur rose à rouge suivant la capacité de l'isolat à fermenter l'hydrate de carbone.

La plupart (96 à 97 %) des souches d'*E. coli* produisent de la β-D-glucuronidase.³ L'enzyme hydrolyse le MUG en 4-méthylumbelliférone, composé fluorescent sous un rayonnement UV à grande longueur d'onde (366 nm). L'ajout de MUG à la formulation confère aux souches d'*E. coli* positives pour la β-D-glucuronidase une fluorescence bleu-vert sous la lampe à UV.

VII REACTIFS

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

Formule approximative* par litre d'eau purifiée

Digestion pancréatique de caséine	14,5 g	Gélose	14,0 g
Digerido papaico de harina de soja	5,0 g	Facteurs de croissance	1,5 g
Clorure de sodium	5,0 g	Sang de mouton défibriné	5%

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

BD BBL MacConkey II Agar with MUG

Formule approximative* par litre d'eau purifiée

Digestion pancréatique de gélatine	17,0 g	Chlorure de sodium	5,0 g
Digestion pancréatique de caséine	1,5 g	Rouge neutre	0,03 g
Digestion peptique de tissu animal	1,5 g	Cristal violet	0,001 g
Lactose	10,0 g	MUG (4-méthylumbelliféryl-β-D-glucuronide)	0,1 g
Sels biliaires	1,5 g	Gélose	13,5 g

*Ajustée et/ou complétement 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 »⁴⁻⁷ 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 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 la durée d'incubation recommandée. Laisser le milieu s'équilibrer jusqu'à la 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 PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons adaptés à la culture peuvent être préparés selon différentes techniques. Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.^{8,9} Prélever les échantillons avant l'administration des agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

IX MÉTHODE

Matériaux fournis

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) et **BD BBL MacConkey II Agar with MUG – BD I Plate**

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 et humide, mais sans excès d'humidité.

Strier sans attendre les milieux avec l'échantillon, dès son arrivée au laboratoire. La boîte d'étalement sert essentiellement à isoler des cultures pures à partir d'échantillons contenant une flore mixte. Si le prélèvement doit être mis en culture directement à partir d'un écouvillon, rouler ce dernier sur une petite surface de la gélose près du bord de la boîte, puis strier la gélose partir de cette zoneensemencée.

Incuber les boîtes à l'abri de la lumière, à 35 ± 2 °C, pendant 18 à 24 h. Incuber les échantillons d'origine respiratoire en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone. Incuber les autres types d'échantillons en atmosphère aérobie non enrichie en CO₂.

Contrôle de qualité par l'utilisateur

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 RÉSULTATS

A l'issue de l'incubation, la plupart des boîtes présentent une zone de croissance agglomérée. Comme la méthode de triage est en fait une technique de « dilution », un nombre décroissant de microorganismes est déposé sur la gélose striée. De ce fait, une ou plusieurs de ces zones doivent présenter des colonies isolées des microorganismes présents dans l'échantillon. En outre, la croissance de chaque microorganisme peut être évaluée de façon semi-quantitative sur la base de la croissance dans chacune des zones striées.

Généralement, les colonies isolées sur la **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** présentent la morphologie suivante :

1. Les streptocoques hémolytiques peuvent apparaître sous la forme de colonies translucides ou opaques, grisâtres et de petite taille (1 mm) ou mates, d'aspect muqueux et de grande taille (2 à 4 mm), cernées par une zone d'hémolyse. Des colorations de Gram doivent être réalisées puis examinées pour confirmer les observations macroscopiques. (D'autres microorganismes susceptibles de provoquer une hémolyse, notamment *Listeria*, différentes corynebactéries, les staphylocoques hémolytiques, *Escherichia coli* et *Pseudomonas*.) Une estimation du nombre de colonies de streptocoques hémolytiques pourra être utile au clinicien.
2. Les pneumocoques se présentent habituellement sous la forme de colonies très plates, lisses, translucides, grisâtres et parfois d'aspect muqueux, cernées d'une zone étroite d'alpha-hémolyse verte.
3. Les staphylocoques apparaissent sous forme de colonies opaques, blanches à jaune doré, entourées ou non d'une zone de bêta-hémolyse.
4. *Listeria*. De petites zone de bêta-hémolyse apparaissent. Les colonies peuvent facilement être distinguées par leur forme en bâtonnet dans les colorations et leur motilité à température ambiante.
5. Il est vraisemblable que d'autres microorganismes représentant des flores minimales et des isolats importants sur le plan clinique se développent sur cette formulation non sélective.

Généralement, les colonies isolées sur la **BD BBL MacConkey II Agar with MUG** présentent la morphologie suivante :

Les colonies de bactéries qui fermentent le lactose sont de couleur rose à rose-rouge, éventuellement entourées d'une zone de précipitation de la bile, alors que les colonies ne fermentant pas le lactose sont incolores. Examiner le milieu sous une lampe UV à grande longueur d'onde (366 nm). Les colonies positives pour la β -D-glucuronidase possèdent une fluorescence bleu-vert alors que les colonies négatives pour la β -D-glucuronidase ne sont pas fluorescentes.

XI LIMITES DE LA PROCÉDURE

Selon certains auteurs, des *Enterobacteriaceae* et des *Pseudomonas aeruginosa* sont inhibés sur la **BD BBL MacConkey Agar** lorsqu'elle est incubée sous une atmosphère enrichie en CO₂.¹⁰

Toutes les souches d'*E. coli* ne fermentent pas le lactose ni ne produisent de la β -D-glucuronidase. Certaines souches de *Salmonella* et de *Shigella*, qui produisent de la β -D-glucuronidase, seront fluorescentes sous la lampe UV.¹¹ Des auteurs ont observé une fluorescence chez un petit pourcentage de *Yersinia* et de streptocoques.¹²

Pour procéder à l'identification, les microorganismes doivent se trouver en culture pure. L'identification définitive nécessite des tests morphologiques, biochimiques et/ou sérologiques. Consulter les publications citées en référence pour plus d'informations sur les méthodes recommandées.^{8,9,13}

XII CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

La **BD BBL Trypticase Soy Agar (TSA) with 5% Sheep Blood** a servi de contrôle lors d'une étude utilisant une culture améliorée en bouillon (Todd Hewitt) et une méthode de dosage immunologique optique pour diagnostiquer une infection à streptocoques β -hémolytiques. 502 échantillons ont été testés. La sensibilité et la spécificité de la TSA complétée de 5 % de sang de mouton étaient de 92,5 % et 99,4 %, respectivement.¹⁴ Nguyen et al. ont utilisé la **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** comme milieu de dépistage de référence de *Streptococcus* du groupe B à partir d'échantillons prélevés dans les voies génitales inférieures chez la femme enceinte.¹⁵ Dans une autre étude, Rossmann et al. sont parvenus à isoler de nouveau *Lautropia mirabilis* sur **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** à partir de prélèvements dans la cavité buccale chez l'enfant infecté par le virus d'immunodéficience humaine.¹⁶ Sur les 85 enfants évalués dans cette étude, 35 (41,4 %) étaient positifs pour *L. mirabilis*. Isenberg et al. ont utilisé la **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** comme contrôle d'évaluation de la mise en évidence d'*Enterococcus* à partir d'un milieu sélectif à l'étude.¹⁷ 250 souches de streptocoques du groupe D isolées à partir d'échantillons cliniques et 8 souches du NCDC (*National Communicable Disease Center*) d'Atlanta aux Etats-Unis ont été utilisées.

BD BBL MacConkey II Agar with MUG

Dans une étude clinique menée dans un centre hospitalier universitaire, la présence de β -glucuronidase a été recherchée par culture sur **BD BBL MacConkey II Agar avec MUG**. Les auteurs ont montré que le délai d'identification des souches d'*E. coli* était ramené d'une heure à cinq minutes et l'identification de ce microorganisme à partir d'échantillons contenant des flores mixtes était améliorée.¹

XIII CONDITIONNEMENT

No réf. Description

221949 **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) et BD BBL MacConkey II Agar with MUG – BD I Plate**

XIV REFERENCES

1. Trepeta, R.W., and S.C. Edberg. 1984. Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 19:172-174.
2. Vera, H.D., and D.A. Power. 1980. Culture media, p. 969. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr., and J.P. Truant (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Killian, M., and P. Bulow. 1976. Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*. I Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B*, 84:245-251.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.). 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
10. Mazura-Reetz, G., T.R. Neblett, and J.M. Galperin. 1979. MacConkey agar: CO₂ vs. ambient incubation, abstr. C 179, p. 339. *Abstr. 79th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 1979.
11. Feng, P.C.S., and P.A. Hartmen. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1320-1329.
12. Robison, B.J. 1984. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:285-288
13. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. *Bergey's Manual™ of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
14. Fries, S.M. 1995. Diagnosis of group A streptococcal pharyngitis in a private clinic: comparative evaluation of an optical immunoassay method and culture. *J. Pediatr.* 126:933-936.
15. Nguyen, T.M., et al. 1998. Detection of group B streptococcus: comparison of an optical immunoassay with direct plating and broth-enhanced culture methods. *J. Matern. Fetal. Med.* 7:172-176.
16. Rossmann, S.N. et al. 1998. Isolation of *Lautropia mirabilis* from oral cavities of human immunodeficiency virus-infected children. *J. Clin. Microbiol.* 36:1756-1760.
17. Isenberg, H.D., D. Goldberg, and J. Sampson, 1970. Laboratory studies with a selective medium. *Appl. Microbiol.* 20: 433-436.

Service et assistance technique : contacter votre représentant local de BD ou consulter le site 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.