BD BBL™ CHROMagar™ Staph aureus

APPLICATION

BBL CHROMagar Staph aureus est un milieu sélectif servant à l'isolement, la numération et l'identification de Staphylococcus aureus à partir d'échantillons d'origine clinique et alimentaire. Des tests de confirmation ne sont pas nécessaires pour les isolats typiques obtenus à partir d'échantillons d'origine clinique.
Le milieu **BBL CHROMagar Staph aureus** (préparé en boîtes de Pétri) a été validé par l'AOAC Research Institute dans le cadre du programme Performance Tested Methods pour l'analyse des œufs en coquille, du saumon fumé et du rôti de bœuf avec les méthodes de référence AOAC et ISO.[1,2] Des tests de confirmation sont nécessaires pour les colonies de couleur mauve isolées à partir des échantillons agroalimentaires cités précédemment.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.
Le pathogène *S. aureus* fait l'objet d'une importante documentation. Il est responsable d'infections pouvant être superficielles ou générales.[3,4] Compte tenu de la prévalence de ce microorganisme et de ses implications cliniques, sa détection est primordiale.
Les intoxications alimentaires causées par *S. aureus* comptent parmi les maladies d'origine alimentaire les plus communes dans le monde. La détection et la numération de ce pathogène donnent des informations sur le risque éventuel pour la santé posé par l'aliment et servent aussi d'indicateurs d'une mauvaise hygiène.[5] Il est également recommandé d'utiliser cet organisme comme indicateur de la qualité de l'eau.[6]
BBL CHROMagar Staph aureus sert à l'isolement, à la numération et à l'identification de *S. aureus* sur la base de la formation de colonies de couleur mauve. L'adition de substrats chromogènes dans le milieu facilite la différenciation de *S. aureus* des autres organismes. L'avantage offert par **BBL CHROMagar Staph aureus** par rapport à certains milieux traditionnels tels que la gélose de Baird-Parker, est sa capacité à identifier *S. aureus* en 24 h au lieu de 48 h.

BBL CHROMagar Staph aureus a été initialement mis au point par A. Rambach, CHROMagar, Paris, France. BD, sous un contrat de licence, en a optimisé la préparation en utilisant les droits de propriété intellectuelle spécifiques servant à la fabrication du milieu préparé **BBL CHROMagar Staph aureus** en boîtes de Pétri. Des peptones **Difco** spécialement sélectionnées fournissent des éléments nutritifs. L'addition d'agents sélectifs inhibe la croissance des organismes Gram négatifs, des levures et de quelques cocci Gram positifs. Le mélange chromogène se compose de substrats artificiels (chromogènes), qui libèrent un composé coloré insoluble lorsqu'ils sont hydrolysés par des enzymes spécifiques. Ceci facilite la détection et la distinction de *S. aureus* des autres organismes. *S. aureus* utilise l'un des substrats chromogènes et produit des colonies de couleur mauve. La croissance de colonies de couleur mauve au bout de 24 h est considérée comme un résultat positif pour *S. aureus* sur **BBL CHROMagar Staph aureus**. Les bactéries autres que *S. aureus* peuvent utiliser d'autres substrats chromogènes et produire des colonies de couleur bleue, bleu-vert ou de couleur naturelle si aucun substrat chromogène n'est utilisé.

*DES ECHANTILLONS FOURNIS PAR LE FABRICANT DE CE MODELE DE TROUSSE DIAGNOSTIQUE ONT ETE EVALUES INDEPENDAMMENT PAR L'AOAC RESEARCH INSTITUTE ET ONT DONNE DES PERFORMANCES CONFORMES AUX SPECIFICATIONS DU FABRICANT STIPULEES DANS LA NOTICE DESCRIPTIVE DE LA TROUSSE DIAGNOSTIQUE. LE FABRICANT CERTIFIE QUE CETTE TROUSSE EST CONFORME EN TOUS POINTS AUX SPECIFICATIONS INITALEMENT EVALUEES PAR L'AOAC RESEARCH INSTITUTE TELLES QUE DECRITES DANS LE CERTIFICAT NUMERO 100503 DE *Performance Tested Methods*[sm].

REACTIFS

BBL CHROMagar Staph aureus

Formule approximative* par litre d'eau purifiée

Chromopeptone	40,0 g
Chlorure de sodium	25,0 g
Mélange chromogène	0,5 g
Agents inhibiteurs	0,07 g
Gélose	14,0 g

pH : 6.8 +/- 0.2

*Ajustés et/ou complétés en fonction des critères de performance imposés.

PRECAUTIONS

IVD . A usage professionnel uniquement.

En présence d'une condensation excessive, inverser le fond de la boîte sur le couvercle excentré 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. Conserver à l'abri de la lumière pendant le séchage. Voir **STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION**.

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

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[7-10] et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques.

Respecter les techniques d'asepsie et prendre les précautions en vigueur contre les dangers microbiologiques.

Après utilisation, stériliser à l'autoclave les boîtes préparées, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé avant de les éliminer.

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 congeler ni surchauffer. Les boîtes peuvent être ensemencées jusqu'à leur date de péremption (voir étiquette sur l'emballage) et incubées pendant le délai d'incubation recommandé.

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

Contrôler les performances en ensemençant un échantillon représentatif de boîtes avec des cultures pures de souches de contrôle stables, produisant une réaction connue (pour de plus amples informations, consulter le **MODE D'EMPLOI GENERAL**). Les souches citées dans le tableau ci-dessous sont recommandées pour ces contrôles. Incuber en conditions aérobies pendant 18 à 24 h, à 35 ± 2 °C à l'obscurité.

Souches	**Croissance**
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Croissance ; colonies mauves
Staphylococcus saprophyticus ATCC 15305	Croissance ; colonies vertes à bleu-vert
Proteus mirabilis ATCC 12453	Inhibition (partielle à totale)
Sans ensemencement	Incolore à légèrement ambré, transparent à très légèrement voilé

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations locales, nationales et/ou internationales en vigueur, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé au clinicien de consulter les directives appropriées du Clinical and Laboratory Standards Institute (anciennement NCCLS) pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

METHODE

Matériaux fournis

BBL CHROMagar Staph aureus, fourni en boîte de Pétri **Stacker** de 90 mm

Matériaux requis mais non fournis : Milieux de culture auxiliaires, réactifs, souches de contrôle de qualité et autre matériel de laboratoire nécessaire.

Types d'échantillons

Consulter les publications citées en référence pour plus d'informations sur les méthodes de prélèvement et de préparation des échantillons. Ce milieu sert à l'isolement de *Staphylococcus aureus* à partir de tout type d'échantillons cliniques. (voir également la rubrique **CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE**).
Pour les tests d'échantillons agroalimentaires, utiliser les méthodes standard appropriées pour obtenir de plus amples informations concernant la préparation et le traitement des échantillons en fonction du type de l'échantillon et de la situation géographique.

Mode opératoire du test

Respecter les techniques d'asepsie. La surface de la gélose doit être lisse et humide, mais sans excès d'humidité. Pour les échantillons cliniques, dès que possible après la réception au laboratoire, ensemencer une boîte de **BBL CHROMagar Staph aureus** avec l'échantillon et strier afin de réaliser l'isolement. Si l'échantillon est cultivé à partir d'un écouvillon, rouler délicatement ce dernier sur une petite zone de la surface près du bord, puis strier à partir de cette zone à l'aide d'un ensemenceur à anse. Incuber les boîtes de Pétri en position retournée (gélose en haut) en aérobiose à 35 ± 2 °C pendant 20 h à 24 h.

Pour les échantillons alimentaires, consulter les références et appliquer les méthodes standard appropriées. Ensemencer les échantillons alimentaires homogénéisés sur **BBL CHROMagar Staph aureus** en utilisant la technique par étalement en boîte. Incuber les boîtes de Pétri en position retournée (gélose en haut) en aérobiose à 35 – 37 °C pendant 20 h à 28 h.

Résultats

Au terme d'une durée d'incubation appropriée, examiner les boîtes sur un fond blanc. *S. aureus* produira des colonies de couleur mauve à orange/mauve sur le milieu **BBL CHROMagar Staph aureus**. La plupart des microorganismes à Gram positif, s'ils ne sont pas inhibés, produiront des colonies bleues, bleu-vert ou de couleur naturelle (incolore, blanche ou crème). Les microorganismes à Gram négatif et les levures sont partiellement à complètement inhibés.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

Résultats de performances[12]

Tests cliniques

1. Lors d'un essai en conditions réelles réalisé dans un grand hôpital urbain américain, 201 échantillons prélevés dans la gorge et les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, et 459 échantillons prélevés dans les voies nasales d'autres patients de l'hôpital, ont été évalués sur **BBL CHROMagar Staph aureus**. Le milieu **BBL CHROMagar Staph aureus** a été comparé à une gélose au sang ou une gélose mannitol-sel (Mannitol Salt Agar) et l'identité des isolats a été confirmée par le test de coagulase sur lame. *S. aureus* a été décelé dans 190 échantillons combinés. **BBL CHROMagar Staph aureus** a permis la détection de neuf cultures positives de *S. aureus* que les milieux traditionnels n'ont pas mises en évidence. Quatre résultats faussement positifs potentiels ont été observés sur le milieu **BBL CHROMagar Staph aureus** au bout de 24 h d'incubation : deux corynebactéries et deux staphylocoques à coagulase négative. Le milieu **BBL CHROMagar Staph aureus** a donc fait preuve d'une sensibilité générale de 99,5 % et d'une spécificité de 99,2 %.[11]

2. Dans une étude européenne, cent soixante cinq (165) échantillons d'un laboratoire de routine, dont 100 échantillons positifs connus et 65 échantillons négatifs connus ont été ensemencés sur **BBL CHROMagar Staph aureus**, gélose mannitol-sel (Mannitol Salt Agar) et gélose Columbia à 5 % de sang de mouton. Les types d'échantillons sont

présentés dans le tableau 1. Les boîtes ont été incubées pendant 20 à 24 heures à 35 – 37 °C, puis examinées afin de déceler les colonies suspectées d'être *S. aureus*. Pour toutes les colonies suspectes sur les trois milieux de culture, on a préparé des tests de détection de la coagulase en tube. De plus, la croissance de *S. aureus* a été déterminée semi-quantitativement.

Tableau 1 : Types d'échantillons

Types d'échantillon	**Echantillons positifs pour *S. aureus* connus**	**Echantillons négatifs pour *S. aureus* connus**
Abcès	14	6
Fluide d'ascites	1	0
Os	1	0
Bourse	1	0
Cathéter	4	0
Drainage	1	0
Fistule	0	1
Echantillons chirurgicaux	12	15
Ecouvillons divers	12	19
Cellulite	1	0
Secrétions trachéales	1	0
Blessures	52	24
Total	100	65

Résultats : Des 165 échantillons, 100 ont donné une croissance de *S. aureus* sur tous les milieux, comme confirmé par les tests de détection de la coagulase pour tous ces milieux.
Sur le milieu **BBL CHROMagar Staph aureus**, 100 échantillons ont présenté un développement de *S. aureus* ; sur la gélose mannitol-sel, une croissance de *S.aureus* a été observée pour 91 échantillons ; sur la gélose Columbia en combinaison avec les tests de détection de la coagulase, 98 échantillons se sont avérés positifs pour *S. aureus*.
Le milieu **BBL CHROMagar Staph aureus** a donné un faux positif qui s'est avéré être *Streptococcus agalactiae*. Suite au ré-ensemencement de la souche sur **BBL CHROMagar Staph aureus**, les colonies sont devenues violettes au lieu de roses à mauves.
En ce qui concerne les échantillons négatifs connus, cinq ont donné en culture des colonies de couleur violette ou lilas qui étaient similaires à *S. aureus* par la couleur. Celles-ci ont pu néanmoins être facilement différenciées des colonies de *S. aureus* (=roses à mauves) par la lectrice qui n'était pas trop familiarisée avec les couleurs des colonies des différentes espèces croissant sur le milieu (seulement un résumé des couleurs et des organismes apparaissant sur le milieu lui avait été fourni avant le début de l'étude).
La sensibilité de **BBL CHROMagar Staph aureus** (établie sur la base de la coloration rose à mauve des colonies), de la gélose mannitol-sel (établie sur la base de la présence de colonies entourées de milieu jaune) et de la gélose Columbia (établie sur la base de croissance des colonies typiques de *S. aureus* combinée au test de détection de la coagulase) était respectivement de 100 %, 91 % et 98 %. La spécificité de **BBL CHROMagar Staph aureus** était de 98,5 %.
Sur le milieu **BBL CHROMagar Staph aureus**, l'intensité de la croissance était de manière significative plus fréquemment supérieure à celle sur MSA (p=0,05) ; voir tableau 2.
BBL CHROMagar Staph aureus peut être utilisé pour une large gamme d'échantillons.

Tableau 2 : Comparaison de l'intensité de la croissance des isolats de *S. aureus* sur CSA* et MSA*

	Intensité de la croissance					
	CSA = Col	CSA> Col	Col>CSA	CSA=MSA	CSA>MSA	MSA>CSA
Nombre d'échantillons	74	12	14	74	18**	8

* CSA, **BBL CHROMagar Staph aureus** ; MSA, gélose mannitol-sel ; Col, gélose Columbia avec 5 % de sang de mouton

** différence statistiquement significative (p=0,05)

Tests des échantillons agroalimentaires

BBL CHROMagar Staph aureus a été validé par l'AOAC Research Institute dans le cadre du programme Performance Tested Methods. Le milieu fait l'objet d'une évaluation externe par un laboratoire de référence et d'une évaluation interne par BD, de sa capacité de mise en évidence et de numération de *S. aureus* dans le rôti de bœuf cuit, le saumon fumé et les œufs en coquille. La détection et la numération de *S. aureus* sur **BBL CHROMagar Staph aureus** ont été comparées à celles obtenues sur les milieux de référence en boîtes de Pétri de l'AOAC et de l'ISO et sur la gélose de Baird-Parker, en utilisant les diluants recommandés pour les inoculums faible, moyen et élevé de *S. aureus*. On a effectué la numération sur **BBL CHROMagar Staph aureus** au bout de 24 h d'incubation et sur la gélose de Baird-Parker au bout de 48 h. Les analyses statistiques n'ont révélé aucune différence significative entre les méthodes de référence et la méthode **BBL CHROMagar Staph aureus** pour tous les types d'échantillons agroalimentaires et tous les niveaux de contamination, sauf pour un échantillon de saumon fumé contaminé par un faible inoculum. Le faible niveau de contamination du saumon fumé établit une différence statistique au niveau du test interne avec la méthode ISO, à savoir la méthode sur **BBL CHROMagar Staph aureus** au bout de 24 h a mis en évidence plus de colonies ($\log_{10}$ = 2,04) que la méthode de référence ISO au bout de 48 ($\log_{10}$ = 1,64). Les estimations de la répétabilité de la méthode **BBL CHROMagar Staph aureus** étaient satisfaisantes. Les coefficients de corrélation variaient de 92,6 % à 99,4 %, démontrant ainsi une bonne corrélation pour tous les types de contamination dans tous les types d'échantillons agroalimentaires. Les données sont récapitulées dans les tableaux 1 et 2. Aucune colonie faussement positive n'a été isolée à partir des échantillons agroalimentaires au moyen de la méthode **BBL CHROMagar Staph aureus**. Toutes les colonies mauves ont été confirmées être *S. aureus* sans aucun désaccord. De plus, 30 souches de *S. aureus*, y compris des souches productrices d'entérotoxine connues, et 37 isolats non *S. aureus* ont été évalués et les deux groupes ont donné une sensibilité et une spécificité de 100 % sur **BBL CHROMagar Staph aureus**.[11]

Tableau 1. Récapitulatif des tests externes de référence AOAC et ISO pour le rôti de bœuf cuit et les oeufs en coquille [1-3]

		AOAC		
	Taux d'inoculum	**Test t pour échantillons appariés ou analyse de variance à une voie[a]**	**Répétabilité (écart type)[b]**	**Carré du coefficient de corrélation linéaire**
Rôti de bœuf cuit	Faible	Non significatif	0,398	96,0 %
	Milieu	Non significatif	0,04	
	Elevé	Non significatif	0,062	
Œufs en coquille	Faible	Non significatif	0,302	95,5,%
	Milieu	Non significatif	0,089	
	Elevé	Non significatif	0,143	

		ISO		
	Taux d'inoculum	**Test t pour échantillons appariés ou analyse de variance à une voie[a]**	**Répétabilité (écart type)[b]**	**Carré du coefficient de corrélation linéaire**
Rôti de bœuf cuit	Faible	Non significatif	0,315	94,6 %
	Milieu	Non significatif	0,045	
	Elevé	Non significatif	0,117	
Œufs en coquille	Faible	Non significatif	0,341	92,6 %
	Milieu	Non significatif	0,223	
	Elevé	Non significatif	0,135	

Notes en bas de page, voir tableau 2

Tableau 2. Récapitulatif des tests interne et externe AOAC et ISO pour le saumon fumé

	Taux d'inoculum	**Test t pour échantillons appariés ou analyse de variance à une voie[a]**		**Répétabilité (écart type)[b]**		**Carré du coefficient de corrélation linéaire**	
AOAC Saumon fumé	Faible	Non significatif	Non significatif	0,132	0,271	99,4 %	93,2 %
	Milieu	Non significatif	Non significatif	0,055	0,095		
	Elevé	Non significatif	Non significatif	0,064	0,161		
ISO Saumon fumé	Faible	Non significatif	Significatif	0,158	0,227	98,7 %	97,4 %
	Milieu	Non significatif	Non significatif	0,135	0,165		
	Elevé	Non significatif	Non significatif	0,116	0,033		

a Un test t pour échantillons appariés et une analyse de la variance ont servi à évaluer la performance de **BBL CHROMagar Staph aureus** par rapport au milieu de référence grâce à la comparaison de la moyenne du $\log_{10}$ des nombres de colonies.
b La répétabilité montre que **BBL CHROMagar Staph aureus** donne des résultats comparables pour tous les tests exécutés sur le même matériau et avec la même méthode.
c Le carré du coefficient de corrélation linéaire sert à évaluer la précision des méthodes quantitatives pour les différents comptes de *S. aureus*.
d **BBL CHROMagar Staph aureus** a mis en évidence plus de colonies que la méthode de référence ISO.

Limites de la méthode

A l'occasion, quelques souches de staphylocoques autres que *S. aureus*, telles que : *S. cohnii*, *S. intermedius* et *S. schleiferi*, ainsi que des corynebactéries et des levures peuvent produire des colonies de couleur mauve au bout de 24 h.[11] La différenciation de *S. aureus* de ces organismes non *S. aureus* peut être accomplie par le test à la coagulase, d'autres tests biochimiques ou la coloration de Gram. Des bacilles Gram négatifs, présentant l'aspect caractéristique de colonies bleues de petite taille peuvent aussi apparaître.
Une incubation au-delà de 24 h (échantillons cliniques) et 28 h (échantillons alimentaires) n'est pas conseillée en raison d'une augmentation du potentiel de faux positifs. Si la durée d'incubation est dépassée, l'identité des colonies de couleur mauve doit être confirmée avant d'être rendues comme *S. aureus*.
Une incubation d'une durée inférieure à la durée recommandée (20 à 24 h) peut diminuer le pourcentage de résultats corrects.
En raison du pigment doré naturel de certaines souches de *S. aureus*, les colonies peuvent apparaître de couleur orange-mauve.

REFERENCES

1. AOAC Official Method 9755.55. *Staphylococcus aureus* in foods. Surface plating method for isolation and enumeration. 1976.
2. International Organization for Standards (ISO). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird Parker agar medium, 1st ed., ISO 6888-1:1999.
3. Jablonski, L.M. and G.A. Bohach. 1997. *Staphylococcus aureus*. In M. Doyle, L. Beuchat and T. Montville (eds.), Food microbiology fundamentals and frontiers. ASM, Washington, DC.
4. Bannerman, T.L. 2003. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Yolken (eds.), Manual of clinical microbiology, 8th edition. ASM, Washington DC.
5. Bennett, R.W. and G.A. Lancette. 1998. *Staphylococcus aureus*. In FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
6. Toranzos, G.A., G.A. McFeters and J.J. Borrego. 2002. Detection of microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. In C. Hurst, R. Crawford, G. Knudsen, M. McInerney and L. Stetzenbach (eds.), Manual of environmental microbiology, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Approved Guideline M29. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections.*Search for latest version at* **www.clsi.org**
8. 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.
9. 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, DC.
10. 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.
11. Données disponibles, archives de BD Diagnostic Systems.

CONDITIONNEMENT

REF 257074	Milieux en boîtes de Pétri prêts à l'emploi, 20 unités par carton
REF 257099	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/

AOAC is a trademark and Performance Tested is a service mark of AOAC International.
CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.
Difco is a trademark of Difco Laboratories, subsidiary of Becton, Dickinson and Company.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection
BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2011 BD