

MODE D'EMPLOI GENERAL

Milieux prêts à l'emploi et partiellement préparés

Le présent document décrit la structure des documents intitulés **Mode d'emploi**, et fournit des informations complémentaires sur l'utilisation des milieux **BD** prêts à l'emploi et partiellement préparés.

Les informations complémentaires non fournies dans les modes d'emploi sont énoncées dans le présent document dans des encadrés tels que celui-ci.

L'**en-tête** de la page 1 des documents porte la **marque CE** si le produit concerné est de type **IVD** au sens de la directive européenne sur les diagnostics *in vitro* (IVD).¹ Cet en-tête présente également le **numéro** et la **version du document** (p. ex. PA-123456.01 pour les milieux en boîte de Pétri et BA-123456.01 pour les milieux en flacon), ainsi que la **date de révision** (mois et année). Le numéro et la version du document sont répétés sur chaque **pied de page**.

Le **nom du produit** est indiqué ensuite. Certains documents **Mode d'emploi** décrivent plusieurs milieux dont les formulations et les applications sont similaires.

APPLICATION

Cette section indique le champ d'application du produit. Si celui-ci est employé à une autre application, il appartient à l'utilisateur de vérifier si le milieu ou la méthode sont appropriés.

BD Diagnostic Systems décline toute responsabilité si le produit est utilisé pour des applications, des microorganismes ou des méthodes non recommandées dans le **Mode d'emploi** de ce produit.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Cette section énonce le principe de la méthode (« Méthode microbiologique »). De plus, elle fournit des informations sur l'historique et sur le développement du milieu et explique le principe de la méthode ainsi que la fonction des ingrédients indiqués dans la section **REACTIFS**.

REACTIFS

Cette section présente la formule et le pH du produit.

Dans le tableau de la formule, l'unité de mesure des ingrédients [g, mg, µg, mL, UI, U, etc.] est mentionnée à sa première occurrence seulement. Elle n'est mentionnée à nouveau que si l'unité change. Voici un **exemple** :

BD CHROMagar O157

Formule* par litre d'eau purifiée

Chromopeptone	22,0 g	
Chlorure de sodium	5,0	← quantité en [g]
Tellurite de potassium	2,5 mg	
Céfiximine	0,05	← quantité en [mg]
Cefsulodine	4,0	← quantité en [mg]
Mélange chromogène et sélectif spécial	1,0 g	
Gélose	12,0	← quantité en [g]

pH : 7,1 ± 0,2

PRECAUTIONS

Les milieux **BD** prêts à l'emploi ou partiellement préparés portant l'étiquette **IVD** sont réservés aux diagnostics *in vitro* tels que définis par la directive européenne sur les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.¹ Ils peuvent aussi être employés dans d'autres domaines de la microbiologie, selon les indications données dans leur mode d'emploi.

Ces produits sont exclusivement à usage professionnel et seul un personnel dûment qualifié ou formé doit être autorisé à les utiliser. Ils ne doivent pas être utilisés par les patients pour des auto-examens.

Les produits étiquetés « Pour usage en laboratoire » sont exclusivement réservés à des usages de microbiologie industrielle ou générale, de biotechnologie ou d'hygiène générale, et ils ne doivent jamais être employés pour traiter des échantillons cliniques d'origine humaine.

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

Respecter les procédures de manipulation aseptique des échantillons et du produit avant, pendant et après utilisation.

Sûreté biologique et chimique du produit

Cette section peut également présenter des informations concernant des risques biologiques et/ou chimiques, signalés par les symboles correspondants ainsi que par les mentions « risque » et « sécurité » appropriées.²

En ce qui concerne les risques provenant des matières animales utilisées, **BD** a pour politique de se procurer ces matières principalement d'Australie, de Nouvelle-Zélande et des Etats-Unis. Aucun de ces pays n'a signalé de cas d'ESB (encéphalopathie spongiforme bovine) dans son bétail natif. **BD** se procure également des matières d'origine animale dans d'autres pays [p. ex. l'Argentine, le Brésil, la Colombie, le Mexique, l'Afrique du Sud et l'Uruguay]. Aucun de ces pays non plus n'a signalé de cas d'ESB dans son bétail natif.

Risques biologiques dus aux échantillons et aux microorganismes cultivés sur des milieux microbiologiques

Respecter les précautions en vigueur contre les risques microbiologiques. Les échantillons et les cultures de microorganismes doivent être manipulés conformément aux directives et à la législation locales relatives aux risques biologiques. La directive européenne 2000/54/CE inclut dans le groupe de risque 2 la plupart des agents pathogènes bactériens et fongiques. Le groupe de risque 3** a été créé pour réunir *Salmonella* Typhi, *Escherichia coli* entéro-hémorragique (EHEC, également appelé STEC = Shiga toxin-producing *E. coli*), *Shigella dysenteriae* (type 1) et divers autres champignons et bactéries. Parmi plusieurs autres pathogènes bactériens et fongiques, la totalité des *Brucella* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. ulcerans* et *Histoplasma capsulatum* sont compris dans le groupe de risque 3. Pour plus d'informations, consulter l'annexe III de la Directive 2000/54/CE.³ Celle-ci, ainsi que les autres directives européennes, sont accessibles sur www.europa.eu/index.htm.

Elimination des produits usagés

Après usage et avant élimination, les récipients ayant contenu des échantillons et toutes les matières contaminées, y compris les récipients ayant contenu les milieux de culture utilisés et les cultures contaminées, doivent être stérilisés à l'autoclave pendant 20 à 30 min à une température de 121 °C ou plus (si le volume à stériliser est important), ou incinérés selon des méthodes homologuées.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Les milieux **BD** en boîte de Pétri prêts à l'emploi doivent être conservés à une température de 2 à 8 °C. Les milieux en flacons et sur lames immergées doivent être conservés aux mêmes températures ou à des températures différentes.

La température de conservation est indiquée dans le **Mode d'emploi** du produit, et également sur l'étiquette d'emballage ou sur le carton de celui-ci.

Ne pas congeler ni surchauffer les produits.

La congélation peut entraîner une détérioration complète des géloses ou une précipitation des milieux liquides. Si la température de conservation indiquée est dépassée pendant une durée prolongée, cela peut entraîner la détérioration des ingrédients des milieux. Cela est particulièrement le cas des agents sélectifs tels que les antimicrobiens.
Sur tous les milieux solides, une humidité excessive due à l'eau de

condensation peut apparaître après des variations de température extrêmes (p. ex. passage de 2 à 25 °C, puis à nouveau à 2 °C). Les milieux en boîte de Pétri présentant une humidité excessive doivent être séchés avant d'être ensemencés, par exemple en les plaçant avec leur couvercle ouvert dans un incubateur propre à une température de 30 à 37 °C pendant une durée non supérieure à une heure. Les milieux ne doivent pas se dessécher ! La durée exacte d'exposition dépend de l'humidité de l'air dans l'incubateur.

Les conditions de **conservation du paquet ouvert** sont également précisées. Les indications relatives à la conservation des paquets ouverts de piles de milieu en boîte de Pétri concernent des conditions de stockage dans un lieu réfrigéré propre.

L'utilisateur doit éviter la contamination en cours de stockage, par exemple en emballant les boîtes dans des sachets en plastique propres.

En ce qui concerne le stockage des flacons de milieux provenant d'emballages ouverts, la durée de conservation indiquée sur l'étiquette de l'emballage ainsi que sur les flacons ou fioles s'applique, dans la mesure où ceux-ci n'ont pas été ouverts.

Tous les milieux prêts à l'emploi ou partiellement préparés doivent être conservés dans l'obscurité.

Tous les milieux exposés de façon prolongée à la lumière artificielle, à la lumière du soleil ou aux UV peuvent perdre de leur efficacité. Plusieurs milieux, tels que les milieux chromogènes, la gélose Endo et d'autres, sont particulièrement sensibles à une forte illumination avant et pendant l'incubation.

Tous les milieux **BD** prêts à l'emploi ou partiellement préparés peuvent être utilisés jusqu'à leur date de **péremption** puis être incubés pendant les durées recommandées.

A titre d'exemple, il est possible d'ensemencer un milieu mycobactérien à son jour de péremption, et de l'incuber ensuite pendant quatre à six semaines. Éviter tout dessèchement du milieu lors de l'incubation. La date de péremption (symbole du sablier) est indiquée sur chaque récipient ainsi que sur l'étiquette de l'emballage. Elle est toujours exprimée dans l'ordre année-mois-jour. Ainsi, 2004-06-09 signifie le 9 juin 2004.

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Il appartient à l'utilisateur d'exécuter les procédures de contrôle de qualité indiquées dans les **modes d'emploi**. Les souches de test mentionnées dans cette section correspondent généralement, mais pas toujours, aux souches utilisées par le fabricant dans les procédures de contrôle de qualité appliquées lors des tests en usine, lesquels peuvent porter sur un nombre plus important de souches d'épreuve. La plupart des souches sont fournies par l'American Type Culture Collection (= ATCC ; www.atcc.org), mais certaines proviennent de fournisseurs européens tels que Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (= DSM ; www.dsmz.de) ou The National Collection of Type Cultures (= NCTC ; www.hpacultures.org.uk).

Le **certificat d'analyse** de chaque lot de produits indique la batterie de souches de test utilisée en usine ainsi que les résultats obtenus.

Les **procédures appliquées pour un test de performance microbiologique** peuvent dépendre du type de milieu et de la méthode suivie.

Toujours utiliser des suspensions de souches de test fraîches, préparées à partir de cultures de 18 h dans des milieux liquides appropriés (p. ex. Tryptic ou **Trypticase** Soy Broth pour les aérobies et Schaedler Broth with hemin and vitamin K pour les anaérobies). Il est également possible d'utiliser des suspensions fraîches préparées à partir de cultures de 18 h sur des milieux en boîte de Pétri. La durée d'incubation des précultures doit être prolongée si la souche de test a une croissance lente.

Pour **tester la capacité nutritive d'un milieu en boîte de Pétri** selon la norme CLSI M22, diluer la suspension de l'inoculum de façon à obtenir 1 à 2 x 10⁴ UFC par boîte.⁴ Si cela ne permet pas d'isoler des colonies, diluer l'inoculum au 1/10^{ème}. La norme DIN EN 12322 stipule que les propriétés de stimulation de croissance doivent être testées avec 100 à 1 000 UFC, ou une quantité suffisante d'UFC pour obtenir des colonies isolées par une technique appropriée de striation en boîte de Pétri.⁵ Si les souches sontensemencées par une technique quantitative de mise en culture sur boîte de Pétri, une quantité de 50 à 500 UFC par boîte convient généralement pour obtenir une quantité dénombrable de colonies. Les directives de l'USP et de la PE préconisent l'utilisation de 10 à 100 UFC par boîte (ou récipient).^{6,7}

Pour **tester la capacité inhibitrice d'un milieu sélectif en boîte de Pétri**, il convient d'utiliser 1 à 2 x 10⁵ UFC par boîte pour l'ensemencement d'après CLSI M22, et environ 10⁴ UFC ou davantage d'après DIN EN 12322.^{4,5} Les inoculum très chargés en souches indésirables peuvent « surcharger » le milieu et entraîner une croissance excessive.

Pour établir une comparaison, toujours prévoir un milieu de culture témoin (milieu de référence), celui-ci étant constitué d'un milieu non sélectif assurant une croissance optimale de toutes les souches de test. A cet effet, il est recommandé d'utiliser une Columbia Agar with 5% Sheep Blood pour les souches d'aérobies, une Chocolate Agar pour les souches de microorganismes exigeants (tels que *Neisseria gonorrhoeae*), une Schaedler Agar with Vitamin K and 5% Sheep Blood pour les souches d'anaérobies et une Sabouraud Glucose Agar pour les champignons. Pour un test quantitatif, la croissance des souches souhaitées sur le milieu de test doit correspondre à au moins 70 % de celle apparaissant sur le milieu témoin. Sur les milieux sélectifs, la croissance de souches « indésirables » doit être partiellement à complètement inhibée. Le degré d'inhibition dépend du milieu et des souches, mais la croissance est généralement réduite selon un facteur de 10³ à 10⁴ (ou davantage), comparé à la croissance sur le milieu de culture témoin non sélectif.

Pour tester la **performance de croissance des milieux en fioles et en flacons**, des méthodes comparables sont employées. D'après la norme CLSI M22, les tubes et fioles de petite taille doivent êtreensemencés avec 10⁵ UFC.⁴ Les procédures PE, USP et DIN EN 12322 exigent les mêmes inoculum que ceux indiqués ci-dessus pour les milieux en boîte de Pétri.⁵⁻⁷ Le contenu des fioles ou flacons d'une capacité de remplissage supérieure à 10 mL doit être fractionné en portions aliquotes de 5 ou 10 mL placées dans des tubes stériles et testées de la même manière.

Incuber et examiner les milieuxensemencés en respectant les instructions propres au produit concerné.

Procéder par potentiométrie à température ambiante (25° C) pour vérifier que

le **pH** est conforme aux valeurs spécifiées pour le produit. La plage de valeurs de pH indiquée dans le document **Mode d'emploi** est déterminée après la fabrication du milieu. Elle peut varier légèrement au cours de la période de conservation de celui-ci, et peut dépendre du système d'électrodes utilisé.

L'utilisateur peut tester la **stérilité du produit** en incubant plusieurs boîtes de Pétri (ou des récipients, p. ex. flacons) à une température appropriée (p. ex. 28 à 35 °C) pendant 5 à 7 jours ou autre durée concordant avec les procédures appliquées.^{6,7}

Pour déterminer la stérilité des milieux liquides naturellement troubles, ceux-ci doivent être repiqués sur un milieu solide approprié (p. ex. **Trypticase Soy Agar** en boîtes de Pétri) après l'incubation. En cas de doute, il est possible de procéder par colorations de Gram et examens au microscope.

METHODE

La section **Matériaux fournis** présente les milieux et les types de récipient dans lesquels ils sont fournis. La plupart des milieux **BD** en boîte de Pétri prêts à l'emploi sont fournis dans des boîtes **BD Stacker** de 90 mm conçues pour s'interbloquer afin de réduire au minimum les risques de glissement des piles. Selon leur application, certains milieux **BD** en boîte de Pétri prêts à l'emploi sont fournis dans des boîtes de types différents, p. ex. à deux compartiments, à contact, de 150 mm ou carrées.

Les milieux **BD** prêts à l'emploi ou partiellement préparés en flacons ou en fioles existent dans une grande diversité de tailles, de capacités de remplissage et de systèmes de fermeture, selon leur usage et leur application.

Cette section présente des informations sur l'état microbiologique du produit :

Les milieux en boîte de Pétri, les lames immergées, ainsi que certains milieux en flacons ou en fioles, sont remplis en conditions aseptiques. Ce sont des produits « contrôlés microbiologiquement ». Pour ces milieux, la norme DIN EN 12322 tolère un taux de contamination $\leq 5\%$.⁵ Cependant, les critères appliqués en usine sont plus rigoureux.

Les milieux en flacons qui sont stérilisés dans leur récipient définitif sont étiquetés avec les symboles « stérile » et « thermomètre » (signifiant « stérilisé à l'autoclave »). Pour ces milieux, les critères de la PE concernant les produits stériles s'appliquent.⁶

La section **Matériaux non fournis** énumère les équipements spéciaux nécessaires pour réaliser le test. Les équipements standard tels qu'ensemenciers à anse, râteaux, multipipettes, incubateurs, etc., ne sont pas spécifiés ici puisqu'il s'agit du matériel normal d'un laboratoire de microbiologie.

La section **Types d'échantillons** présente les échantillons devant être utilisés avec le milieu concerné. Le cas échéant, une section **Prélèvement et transport** précise les conditions spéciales applicables pour le prélèvement et le transport des échantillons.

Les échantillons doivent être prélevés et transportés suivant des méthodes appropriées et à l'aide de milieux de transport adaptés afin d'éviter une dessiccation, une exposition excessive à l'oxygène et la prolifération de microorganismes commensaux. Le laps de temps, qui doit être aussi court que possible, entre le prélèvement des échantillons et leur traitement en laboratoire, est important également. Consulter les publications citées en référence pour plus d'informations sur les méthodes de prélèvement et de transport d'agents pathogènes spécifiques.⁸

La section **Mode opératoire du test** fournit des informations générales et spécifiques concernant l'ensemencement du milieu et, le cas échéant, décrit l'utilisation de milieux complémentaires.

Ensemencement des milieux

Pour l'ensemencement des milieux avec les échantillons, il est recommandé aux laboratoires de réaliser une striation créant l'isolement en trois étapes par boîte, l'ensemencement à anse étant re-stérilisé avant chaque étape. Si les anses sont de type pré-stérilisé, une anse différente doit être utilisée pour chaque étape. Si la matière est cultivée directement à partir d'un écouvillon, rouler ce dernier sur une petite zone de la surface près du bord puis, à l'aide des anses, créer l'isolement en striant en deux étapes l'échantillon depuis cette zone ensemencée.

Cette technique permet d'isoler des colonies seules à partir de cultures mixtes. Il est impératif d'utiliser des cultures pures, obtenues à partir de colonies seules, pour effectuer les tests d'identification et de sensibilité des isolats.

Cette section spécifie également la température et la durée d'incubation applicables.

Il est recommandé aux laboratoires de vérifier à intervalles réguliers la **température réelle de leurs incubateurs**. En effet, les températures inférieures et supérieures à la plage préconisée peuvent entraîner une perte de viabilité des microorganismes présents dans les cultures, une croissance médiocre ou des résultats impossibles à reproduire.

Pendant l'incubation des milieux en boîte de Pétri prêts à l'emploi, prévoir une **humidité** adéquate, en particulier si l'incubation doit être assez longue. Dans ce dernier cas, ne pas utiliser d'incubateurs à circulation d'air, qui peuvent considérablement dessécher les milieux, surtout si l'humidité ambiante du laboratoire est peu élevée. Les cultures en boîte de Pétri de microorganismes adaptés aux environnements humides, p. ex. *Legionella*, doivent être incubées dans des enceintes ou récipients humidifiés. Les boîtes de Pétri peuvent aussi être scellées avec du ruban adhésif afin d'empêcher l'évaporation. Cependant, un échange gazeux minimal doit rester possible.

Cela s'applique également aux milieux en tubes : les bouchons à vis doivent toujours être légèrement desserrés pendant l'incubation.

La section **Résultats** décrit l'aspect des microorganismes devant apparaître dans le milieu. Lorsqu'il s'agit d'un milieu d'isolement ou de culture polyvalent, ces informations spécifiques ne sont pas données pour tous les microorganismes susceptibles de se développer. Dans un tel cas, il convient de consulter les publications citées en référence.⁹

Eventuellement, une section **Calcul et interprétation des résultats** peut fournir des informations spécifiques. Elle est ajoutée si un diagnostic est fonction de la quantité d'agents pathogènes présents dans les échantillons. Cela est le cas, par exemple, des milieux tels que CLED Agar, qui sert à énumérer les bactéries de l'urine.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

Cette section décrit la performance du milieu et, le cas échéant, les différents types de microorganismes que celui-ci permet d'isoler, en citant les sources d'information correspondantes. Lorsqu'un milieu est nouveau, ou a été lancé récemment, cette section peut citer les résultats obtenus lors des évaluations de performances.

Rappelons qu'un seul milieu suffit rarement à détecter la totalité des microorganismes potentiellement significatifs dans un échantillon. De plus, une population microbienne peut comporter des souches qui ne se développent pas correctement dans un certain milieu alors que ce dernier permet de détecter la plupart des autres souches de la même espèce. Par conséquent, pour la plupart des échantillons, il convient d'ensemencer deux ou trois milieux différents simultanément, ou bien d'associer un milieu non sélectif à un ou deux milieux sélectifs, ou encore d'utiliser deux milieux sélectifs n'ayant pas le même degré de sélectivité.

Cette section précise également les **limites de l'application** connues du milieu. Avec la plupart des milieux, des tests supplémentaires sont nécessaires pour réaliser l'identification définitive des microorganismes isolés.

REFERENCES

Les publications citées dans le document figurent dans cette section.

CONDITIONNEMENT

Cette section répertorie les **numéros de référence**, le **nombre d'unités par carton** et, le cas échéant, les différents formats.

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Cette section fournit des informations telles que l'adresse du fabricant (symbole « usine »). Enfin, les marques de commerce mentionnées dans le document sont indiquées.

REFERENCES CITEES DANS LE PRESENT MODE D'EMPLOI GENERAL

1. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. Official Journal L 331 , 07.12.1998, p. 0001 - 0037
2. Directive 67/548/EEC of the European Parliament and of the Council of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances Official Journal P 196, 16.08.1967, p. 0001 – 0098.
3. 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 98/391/EEC). Official Journal L 262, 17.10.2000, p. 0021-0045.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Standard M22. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media. Wayne, PA, USA. *Search for latest version at www.clsi.org*
5. DIN EN 12322. 1999. Culture media for microbiology – performance criteria for culture media. Beuth Verlag Berlin.
6. Council of Europe. European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France. *Search for latest version at www.pheur.org*
7. U.S. Pharmacopeial Convention. The U.S. Pharmacopeia /The national formulary. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md. *Search for latest version at www.uspnf.com*
8. Thomson, R.B. 2007. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. *In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.). Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.*

9. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.). 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.

CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2009 BD

© 2009 Becton, Dickinson and Company