

COLUMBIA AGAR + 5% DE SANG DE CHEVAL

NOTICE D'UTILISATION POUR LES MILIEUX PRECOULES PRÊTS A L'EMPLOI

1. Utilisation prévue

La gélose Columbia Agar +5% de sang de cheval est un milieu non sélectif utilisé pour la détection qualitative de micro-organismes fastidieux ou non fastidieux dans des échantillons cliniques humains ou non humains.

La fonction du milieu Columbia Agar +5% de sang de cheval est de soutenir le diagnostic chez les patients présentant des symptômes d'infections potentielles par divers micro-organismes pathogènes, y compris *Haemophilus*.

Les micro-organismes pathogènes pour l'homme appartiennent à divers groupes de bactéries qui peuvent provoquer des infections locales des tissus et des organes, ainsi que des infections systémiques.

En raison de ses propriétés, le milieu est utilisé pour détecter de nombreux micro-organismes pathogènes appartenant à différents groupes taxonomiques. Ces micro-organismes comprennent des cocci à Gram positif (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*), des bacilles à Gram négatif (*Enterobacterales*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*), ainsi que des bacilles à Gram positif (*Corynebacterium*). La présence de sang dans le milieu permet de déterminer le type d'hémolyse, ce qui constitue une base d'identification préliminaire de certains groupes de micro-organismes, notamment ceux du genre *Streptococcus*.

Le sang de cheval étant dépourvu d'enzymes capables de dégrader le facteur V, ce milieu est plus adapté que la gélose Columbia au sang de mouton pour l'isolement des bacilles Gram négatif du genre *Haemophilus*.

Référence :	Type de milieu :	Emballage :
1196PD90	Boîte de gélose précoulée	2 x 10 Boîtes (90 mm)

2. Principe de la procédure

Le milieu contient des hydrolysats de protéines de grande valeur qui permettent une croissance abondante et rapide des micro-organismes ayant des besoins nutritionnels élevés. L'amidon de maïs est une source d'énergie qui stimule la croissance bactérienne, absorbe les composants toxiques présents dans l'échantillon testé et améliore la réponse hémolytique de certains streptocoques. La peptone enrichie en levure est une source de vitamines B. L'ajout de sang de cheval fournit le facteur X (hème) et le facteur V (nicotinamide adénine dinucléotide, NAD) nécessaires à la croissance de nombreuses bactéries, y compris *Haemophilus influenzae*, qui a besoin des deux. La présence de sang de cheval permet de déterminer le type d'hémolyse, ce qui est nécessaire pour l'identification initiale des bactéries présentes dans l'échantillon.

3. Composition du milieu

En g/l d'eau distillée :	Suppléments/litre du milieu :
Hydrolysate de caséine	5,0 g
Hydrolysate de tissu animal	8,0 g
Extrait de levure	10,0 g
Agar	14,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Amidon de maïs	1,0 g
	Sang de cheval
	50 mL

pH 7, ±0,2 à 25° C.

Aspect du milieu : Rouge homogène.

4. Préparation du milieu

Le milieu est prêt à l'emploi. Amener le milieu à température ambiante immédiatement avant utilisation.

5. Matériel nécessaire, non fourni

Équipement de laboratoire standard nécessaire pour effectuer des tests microbiologiques, y compris un incubateur ou un incubateur à atmosphère contrôlée.

6. Précautions

- Le produit est destiné à un usage professionnel uniquement.
- Produit non automatisé.
- Le milieu contient des composants d'origine animale, qui peuvent être associés à la présence d'agents pathogènes biologiques, et doit donc être manipulé conformément aux principes de manipulation des matières biologiques potentiellement infectieuses.
- Ne pas utiliser le milieu si celui-ci présente des signes de contamination microbienne, de décoloration, de dessèchement, de fissuration ou d'autres signes de détérioration.
- Ne pas utiliser les boîtes endommagées.
- Ne pas utiliser les boîtes hémolysées
- Ne pas utiliser les boîtes après la date d'expiration.
- La ré incubation de boîte préalablement inoculée n'est pas autorisée.
- Pour garantir des résultats de test corrects, suivre ces instructions.
- Si la manipulation du milieu diffère de celle décrite dans le présent manuel, le laboratoire est tenu de valider la procédure adoptée.

7. Stockage

Conserver les boîtes entre 2 et 12 °C jusqu'à la date de péremption. Conserver les boîtes dans leur emballage d'origine, en position inversée (côté gélose vers le haut), à l'abri des sources de lumière directe. Pour éviter la congélation de la gélose, ne pas conserver les boîtes près des parois du réfrigérateur. Pour éviter l'apparition de condensation d'eau sur le couvercle de la boîte, ne pas ouvrir le réfrigérateur plus souvent que nécessaire et ne pas stocker les boîtes dans un réfrigérateur trop rempli.

8. Date d'expiration

Le milieu conservé à une température comprise entre 2 et 12°C conserve ses propriétés jusqu'à 60 jours à compter de la date de production.

9. Types d'échantillons

Échantillons cliniques humains prélevés principalement dans les oreilles, les voies respiratoires supérieures, les voies génitales, ainsi que les liquides de pus et les fluides exsudatifs.

Prélever des échantillons à analyser conformément aux directives en vigueur. Conserver les échantillons jusqu'à leur livraison au laboratoire conformément à la politique de conservation des échantillons du laboratoire. Conserver les échantillons d'urine et de selles au réfrigérateur. Les écouvillons, les aspirats, les échantillons provenant des voies respiratoires, ainsi que les liquides de pus, les exsudats et autres échantillons prélevés pour les milieux de transport doivent être conservés à température ambiante conformément aux recommandations du fabricant du milieu. Effectuer la culture de l'échantillon dès que possible après la livraison au laboratoire.

10. Procédure de test

1. Laisser le milieu se réchauffer à température ambiante avant l'inoculation.
2. Inoculer l'échantillon en l'étalant directement sur la surface de la gélose.
3. Si l'échantillon est recueilli sur un écouvillon, faites tourner doucement l'extrémité de l'écouvillon sur une petite surface de gélose, juste sur les bords de la boîte, puis inoculer l'échantillon par la méthode des stries à l'aide d'une anse stérile.
4. Incuber les boîtes inoculées dans des conditions aérobies à 35 ±2°C.
5. Afin d'obtenir la croissance de bactéries ayant des exigences de croissance différentes, le milieu peut être incubé dans des conditions aérobies complétées par du CO₂ (5 - 10%) pendant 18-24 ou jusqu'à 48 heures, selon le type d'échantillon à tester et le micro-organisme recherché.
6. Examiner le résultat de la croissance après 18-24 ou 48 heures d'incubation

11. Lecture et interprétation

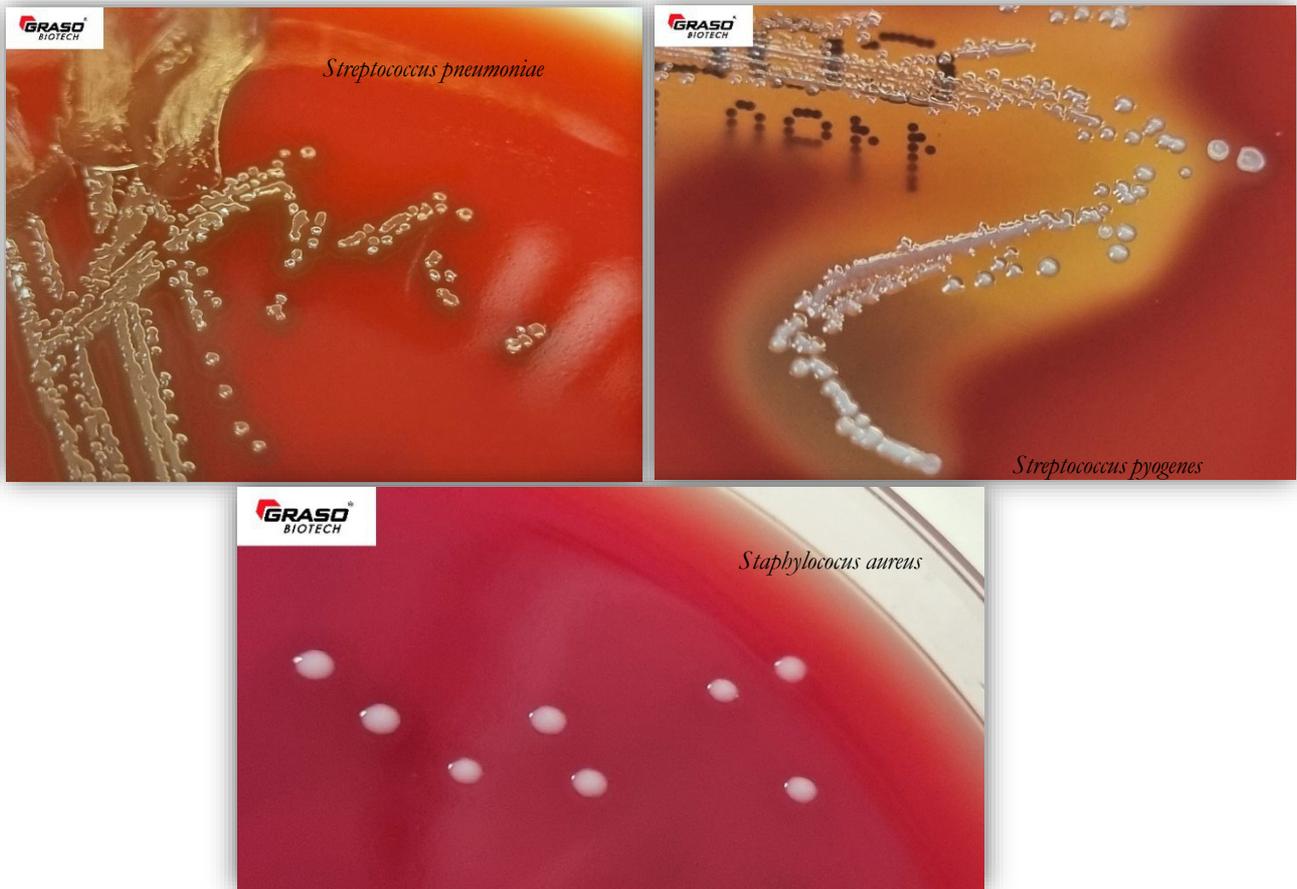
Après incubation, observer :

- la présence d'une colonie bactérienne,
- la morphologie des colonies,
- les changements de couleur du milieu et la présence d'hémolyse.

Morphologie typique de colonies bactériennes cultivées sur milieu Columbia Agar +5% de sang de cheval :

Micro-organisme	Morphologie typique d'une colonie	Présence et type d'hémolyse
Streptocoques du groupe A	Colonies transparentes ou semi-transparentes, d'environ 0,5 mm de diamètre, rondes, à bords entiers et à surface lisse.	Une zone distincte d'hémolyse β autour de la colonie
Streptocoques du groupe B	Grandes colonies d'environ 1 à 2 mm de diamètre	Petite zone de β -hémolyse ou absence d'hémolyse autour de la colonie
Streptocoques bêta-hémolytiques des groupes C et G	Morphologie des colonies similaire à celle des streptocoques du groupe A	Une zone distincte d'hémolyse β autour de la colonie
Streptocoques du groupe D	Colonies plus grandes que les autres groupes de streptocoques, légèrement opalescentes, de couleur grise à blanc grisâtre.	Hémolyse de type β ou absence d'hémolyse
Pneumocoques	Colonies de 0,5-1 mm de diamètre, rondes, à bords entiers, muqueuses.	Incubés dans des conditions de CO ₂ présentent une large zone d'hémolyse de type α .
Streptocoques Viridians	Colonies de petite taille (la taille d'une tête d'épingle) à des colonies de taille égale ou supérieure produites par les streptocoques du groupe A, généralement plus petites que les pneumocoques. Mucus, semi-transparent ou brillant	Colonies entourées d'une petite zone d'hémolyse de type α ou sans hémolyse.
Staphylocoques	Grandes colonies jaunes ou blanches à grises	Pas d'hémolyse ou hémolyse de type β
Corynébactéries	Colonies petites à grandes, blanches à grises ou jaunes	Colonies, avec ou sans zone d'hémolyse
<i>Enterobacterales</i>	Colonies grises de taille moyenne à grande	Colonies avec ou sans zone d'hémolyse
<i>Candida</i> spp.	Petites colonies blanches	-

Pour l'identification définitive des micro-organismes en culture, des tests supplémentaires et/ou des tests d'identification doivent être effectués à l'aide d'autres méthodes utilisées en laboratoire.



Morphologie des colonies et mode de croissance des micro-organismes sur milieu Columbia Agar +5% de sang de cheval

12. Contrôle de la qualité

Les propriétés nutritionnelles du milieu doivent être vérifiées à l'aide de souches de référence donnant les réactions positives attendues. Le test doit être effectué en utilisant des cultures pures de 18 à 24 heures de souches de référence donnant les réactions souhaitées. Utiliser les souches de référence suivantes pour effectuer le contrôle de la qualité du milieu :

Souche de référence :	Intensité de la croissance :	Morphologie des colonies :	Type d'hémolyse :
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Bonne croissance	Grande, plate, grise, lisse, brillante	Pas d'hémolyse
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	Bonne croissance	Grandes, plates, à bords irréguliers, grises, opalescentes	Pas d'hémolyse
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Bonne croissance	Rond, blanc, à bords entiers, lisse, convexe	Possibilité d'hémolyse de type β
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Bonne croissance	Petit, rond, à bords entiers	β -type
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Bonne croissance	petite, blanche à grise,	β -type
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Bonne croissance	Très fin, plat, à bords entiers	α -type

D'autres souches de référence peuvent être utilisées conformément aux procédures et instructions du laboratoire. Les procédures de contrôle de la qualité doivent répondre aux exigences des réglementations et des lignes directrices/recommandations applicables.

13. Limites de la méthode

- En raison de la variabilité des besoins nutritionnels, certaines souches peuvent se développer faiblement ou pas du tout sur le milieu Columbia contenant 5 % de sang de cheval.
- Selon l'origine du sang utilisé, les streptocoques du groupe D peuvent présenter des réactions hémolytiques différentes. Sur les milieux contenant du sang de cheval, de lapin et d'homme, ils réalisent une hémolyse de type β , tandis que sur les milieux contenant du sang de mouton, ils réalisent une hémolyse de type α .
- La réponse hémolytique des streptocoques β -hémolytiques peut également être affectée par les conditions d'incubation. Il est recommandé d'incuber dans des conditions d'augmentation du CO₂ (5-10%) selon les règles et procédures spécifiées par le laboratoire.
- Le milieu se caractérise par une teneur relativement élevée en hydrates de carbone, ce qui signifie que les streptocoques β -hémolytiques peuvent provoquer une réaction hémolytique verdâtre, parfois interprétée à tort comme une hémolyse de type α .
- En fonction du type d'échantillon et du micro-organisme recherché, il est recommandé d'utiliser des milieux supplémentaires, tels que le milieu chocolaté.

14. Caractéristiques de la méthode

En 1966, Ellner et ses collègues ont présenté un milieu multicomposant avec du sang qui, grâce à l'hydrolysate de caséine et aux peptones, a permis d'obtenir une croissance microbienne plus rapide et plus abondante, une hémolyse plus forte et plus claire, et une morphologie de colonie plus typique avec une meilleure coloration.

Le milieu est utilisé pour détecter et isoler les micro-organismes aérobies ayant des besoins nutritionnels élevés, tels que les streptocoques, les entérocoques, les staphylocoques, les mycobactéries, les bacilles Gram négatifs fermentaires et non fermentaires, les levures et d'autres micro-organismes. Le milieu contient du facteur V (nicotinamide adénine dinucléotide, NAD), car le sang de cheval ne contient pas d'enzymes qui dégradent le NAD. Par conséquent, *Haemophilus influenzae*, qui nécessite à la fois le facteur X (hème) et le facteur V, se développera sur ce milieu. Le sang de cheval permet de déterminer le type de réaction hémolytique, ce qui est important pour l'identification préliminaire de certains groupes de bactéries pathogènes. Il convient de noter que la présence ou le type d'hémolyse dépend du type de sang utilisé dans le milieu. *Staphylococcus aureus*, qui présente une hémolyse de type β sur un milieu à base de sang de mouton, n'effectue souvent pas d'hémolyse sur un milieu à base de sang de cheval. Les streptocoques qui hémolysent rarement le sang de mouton, la réaction d'hémolyse sera clairement visible sur le milieu sang de cheval. Certains tests de diagnostic peuvent être effectués directement sur le milieu de sang de cheval. Cependant, afin d'identifier correctement les micro-organismes cultivés, des tests d'identification appropriés doivent être effectués sur des cultures pures.

15. Élimination des matériaux usagés

Les matières usagées et non utilisées doivent être éliminées conformément à la réglementation en vigueur sur les déchets médicaux et aux procédures de laboratoire pour l'élimination des matières infectieuses et potentiellement infectieuses.

16. Déclaration des événements indésirables

Conformément à la réglementation en vigueur, les événements et incidents indésirables qui peuvent être directement liés au milieu décrit doivent être notifiés au fabricant et aux autorités compétentes.

17. Références

1. MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, edited by Mauch, H., R. Lüttiken, and S. Gatermann for the Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Volumes 3, 6, and 7. Urban & Fischer, Munich, Germany.
2. 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..
3. Chapin, K.C., and T.-L. Lauderdale. 2003. reactants, stains, and media. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C..
4. 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..
5. Baron, E. J, L. R. Peterson, and S. M. Finegold. 1994. bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed., p. 415. mosby-Year Book, Inc. St. Louis, MO.
6. MacFaddin, J. F. 1985 Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, p. 86-92. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
7. Difco & BBD Manual, Manual of Microbiology Culture Media, Second Edition, 2009

NOTE**Historique des modifications apportées au document**

Date du changement	Section	Description du changement
2023/02/07	Document complet	Adaptation aux exigences du règlement (UE) 2017/746

NOTE

L'historique des révisions du document n'inclut pas les modifications rédactionnelles.

SYMBOLE	NOM DU SYMBOLE	DESCRIPTION	REF.
	Fabricant	Indique le fabricant de l'instrument médical.	5.1.1
	Date de fabrication	Indique la date après laquelle l'instrument médical ne doit plus être utilisé.	5.1.3
	N° de catalogue	Indique le numéro de catalogue du fabricant afin que le dispositif médical puisse être utilisé.	5.1.6
	Lot	Indique le code de lot du fabricant afin que le lot ou le lot puisse être identifié.	5.1.5
	Dispositif médical de diagnostic in vitro	Indique un instrument médical destiné à être utilisé comme instrument médical de diagnostic in vitro.	5.5.1
	Ne pas réutiliser	Indique un instrument médical destiné à un usage unique.	5.4.2
	Contient suffisamment de tests <n>	Indique le nombre total de tests pouvant être effectués avec l'instrument médical.	5.5.5
	Date limite d'utilisation	Indique la date après laquelle l'instrument médical ne doit plus être utilisé	5.1.4
	Limite de température	Indique que les limites de température doivent être indiquées à côté des lignes horizontales supérieure et inférieure.	5.3.7
	Symbole de sécurité (Respect des exigences de l'UE)	Le marquage CE sur un produit est une déclaration du fabricant attestant que le produit est conforme aux exigences essentielles des réglementations pertinentes de l'Union européenne en matière de santé, de sécurité et d'environnement.	Nd.
	Consulter le mode d'emploi ou consultez le mode d'emploi électronique	Indique la nécessité pour l'utilisateur de consulter le mode d'emploi.	5.4.3
	Stériliser à l'aide de techniques de traitement aseptique	Indique un instrument médical qui a été fabriqué à l'aide de techniques aseptiques acceptées.	5.2.2
	Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter le mode d'emploi	Indique qu'un instrument médical qui ne devrait pas être utilisé si l'emballage a été endommagé ou ouvert et que l'utilisateur devrait consulter le mode d'emploi pour obtenir des renseignements sur la dépendance.	5.2.8
	Contient du matériel biologique d'origine animale	Indique un instrument médical qui contient des tissus biologiques, des cellules ou leurs dérivés d'origine animale	5.4.8




Graso Zenon Sobiecki
Krag 4A ; 8-3200 Starogard Gdański
www.grasobiotech.pl

Département de la production
Leśna 1, Owidz
83-211 Jabłowo

