



BD Tryptic Soy Agar

APPLICATION

La **BD Tryptic Soy Agar** (gélose de soja tryptique), livrée en flacons, est un milieu polyvalent partiellement terminé qui, une fois transféré dans des boîtes de Pétri ou des tubes, favorise la croissance de microorganismes non exigeants et modérément exigeants. En microbiologie clinique, il n'est pas utilisé pour l'isolement de pathogènes à partir d'échantillons cliniques mais peut servir à cultiver des souches bactériennes. Additionné de sang, il peut servir de milieu d'isolement primaire en microbiologie clinique.

PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.

Les qualités nutritionnelles de la Tryptic Soy Agar en ont fait un milieu populaire depuis de nombreuses années. Dans les pharmacopées américaine et européenne, ce milieu porte le nom de Soybean-Casein Digest Agar Medium et apparaît au chapitre du dénombrement des microorganismes aérobies, parmi les procédures de dénombrement des microorganismes.^{1,2}

Le milieu préparé a de nombreuses applications, notamment la constitution de souchothèques, la numération sur plaques et l'isolement de microorganismes issus de matières diverses.³⁻⁵ Ce milieu est répertorié dans les recueils de méthodes d'analyse des eaux, des eaux usées et des aliments.^{6,7}

L'utilisation de ce milieu en microbiologie clinique est limitée car il favorise la croissance de nombreuses bactéries exigeantes. Cependant, comme la Tryptic Soy Agar ne contient pas les facteurs de croissance X et V, elle peut être utilisée pour déterminer les besoins en facteurs de croissance par isolats pour les *Haemophilus* spp., grâce à l'ajout de bandelettes avec facteurs X, V et XV dans des boîtes de Pétri ensemencées.⁸ La **BD Tryptic Soy Agar** peut également être utilisée comme milieu de conservation ou de repiquage pour les souches de référence, notamment les *Enterobacteriaceae* et staphylocoques. Non complété, le milieu n'est pas utilisé comme milieu d'isolement primaire pour les applications cliniques. Enrichi en sang (p. ex. 5 % de sang de mouton), le milieu peut servir à l'isolement de bactéries à partir d'échantillons cliniques.^{9,10}

Dans la **BD Tryptic Soy Agar**, l'association de caséine et des peptones de soja rend le milieu nutritif en fournissant une source d'azote organique, en particulier des aminoacides et des peptides à longue chaîne. Le chlorure de sodium assure l'équilibre osmotique. Les **BD Tryptic Soy Agar** (milieux en flacons) sont des milieux partiellement terminés (semi-finis) et livrés en flacons, à partir desquels l'utilisateur peut préparer un milieu en boîtes de Pétri ou en tubes. Ces milieux sont fabriqués à partir d'un milieu **Difco** déshydraté.

REACTIFS

BD Tryptic Soy Agar

Formule* par litre d'eau purifiée

Bacto Tryptone (digestion pancréatique de caséine)	15,0 g
Bacto Soytone (digestion papaique de semoule de soja)	5,0
Chlorure de sodium	5,0
Gélose	15,0

pH 7,3 ± 0,2

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

PRECAUTIONS

IVD . A usage professionnel uniquement.

Ne pas utiliser des flacons présentant des signes de contamination microbienne, décoloration, dessiccation ou fissure, ou d'autres signes de détérioration. Pour la finalisation de ce milieu partiellement terminé fourni en flacons, se conformer aux méthodes et respecter les avertissements décrits sous **METHODE – Préparation des réactifs**. Consulter le document **MODE D'EMPLOI GENERAL** pour plus d'informations sur les procédures de manipulation aseptique, les risques biologiques et l'élimination des produits usagés.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les flacons dans l'obscurité entre 5 et 25 °C. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Les milieux peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée et incubés pendant les durées recommandées. Les flacons provenant de boîtes déjà entamées peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée. Les flacons ouverts doivent être utilisés immédiatement. Pour la préparation de boîtes de Pétri ou de tubes à partir du milieu conditionné en flacons, celui-ci doit d'abord être liquéfié (voir **METHODE – Préparation des réactifs**). Ne pas liquéfier plus d'une fois le milieu après sa solidification.

CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Milieu non complété : Préparer les boîtes de Pétri ou les tubes, à partir du milieu partiellement terminé (voir **METHODE - Préparation des réactifs**), sans ajouter de supplément, tel que du sang. Ensemencer les boîtes ou les tubes avec les souches de test indiquées dans le tableau ci-dessous : Pour plus d'informations, voir le document **MODE D'EMPLOI GENERAL**. Incuber les bactéries pendant 18 à 48 h en atmosphère aérobie, à 35 ± 2 °C. Incuber *Aspergillus niger* en atmosphère aérobie pendant 3 à 4 jours, entre 25 et 28 °C. Incuber le milieu entre 30 et 35 °C, conformément aux instructions des pharmacopées européenne et américaine.^{1,2}

Souches	Résultats
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Croissance
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Croissance
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Croissance
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Croissance
Sans ensemencement	Couleur légèrement ambrée à ambrée, légèrement opalescente

Milieu complété avec 5 % sang de mouton défibriné : Préparer des boîtes de Pétri plates à partir du milieu partiellement terminé (voir **METHODE – Préparation des réactifs**) et ajouter 5 % de sang de mouton après refroidissement entre 48 et 50 °C. Il est recommandé de tester le milieu complété conformément au standard NCCLS M22-A2.¹¹ Incuber les souches pendant 20 à 24 h en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone.

Souches	Résultats
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Croissance ; bêta-hémolyse
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Croissance ; alpha-hémolyse
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Croissance ; bêta-hémolyse possible
Sans ensemencement	Rouge (couleur sang)

METHODE

Matériaux fournis

BD Tryptic Soy Agar (milieux en flacons partiellement terminés). Voir **CONDITIONNEMENT** pour les volumes de remplissage et les conditionnements.



Matériaux non fournis

Autoclave (réglé à 100 ± 2 °C), autocuiseur à vapeur ou plaque chauffante ; bain-marie (48 à 50 °C) ; sang défibriné (pour la préparation des boîtes contenant uniquement du sang) ; verrerie et boîtes de Pétri en plastique stériles ou tubes stériles. Réactifs et matériel de laboratoire auxiliaires requis.

Préparation des réactifs

Liquéfier la **BD Tryptic Soy Agar** (milieu en flacons) en la chauffant dans un autoclave ou un autocuiseur à vapeur. Ou alors, le flacon peut être déposé dans un récipient contenant de l'eau, placé sur une plaque chauffante et porté à ébullition. **Desserrer légèrement le bouchon avant de chauffer afin de permettre l'échange de pression.**

Avertissement : Il n'est pas recommandé d'utiliser un four à micro-ondes pour liquéfier le milieu. Ne pas mettre de flacons munis de fermetures métalliques dans un micro-ondes.

Si un autoclave est utilisé, régler la température à 100 ± 2 °C au maximum, car une chaleur excessive peut détériorer les composants et engendrer une performance microbiologique insuffisante. En cas d'utilisation d'une plaque chauffante et/ou d'un bain-marie, faire bouillir jusqu'à dissolution totale du milieu. Le temps d'ébullition nécessaire pour atteindre le stade de liquéfaction complète du milieu peut varier considérablement et dépend de plusieurs critères, tels que la température initiale de l'appareil, sa puissance, ses dimensions ou le volume et la température du milieu placé à l'intérieur du récipient. Il est recommandé d'effectuer un test, et d'enregistrer ce délai après la première utilisation.

Après liquéfaction complète, retirer le récipient de l'appareil et le placer dans un bain-marie entre 48 et 50 °C.

Avertissement : Porter des gants de protection contre la chaleur. Ne pas placer le récipient chaud dans un bain de glace ou dans l'eau froide pour accélérer le refroidissement car le verre pourrait se fissurer. Risque de brûlure sévère.

Laisser refroidir le récipient dans le bain-marie le temps nécessaire pour permettre au milieu d'atteindre la température préréglée.

Si du sang défibriné (p. ex. 5 % de sang de mouton) ou d'autres suppléments sensibles à la chaleur (préalablement portés à température ambiante) sont ajoutés, la température du milieu ne doit pas dépasser 50 °C. Respecter les précautions d'asepsie lors de l'ajout de supplément et du remplissage des boîtes de Pétri. Utiliser des boîtes ou des tubes stériles. Une fois le supplément ajouté, mélanger délicatement le milieu, en prenant soin de ne pas provoquer la formation de mousse ni de bulles.

Pour un ensemencement en surface, verser le milieu dans des boîtes de Pétri. Pour une boîte aux dimensions standard, entre 90 et 100 mm, un volume de 19 à 21 mL convient. Attendre que le milieu terminé se solidifie, retourner les boîtes de Pétri et laisser sécher à température ambiante pendant la durée requise (pour obtenir une solidification complète du milieu, conserver pendant une nuit, entre 18 et 23 °C). Envelopper dans des sacs plastiques neufs et conserver entre 2 to 8 °C. Les boîtes de Pétri préparées avec ce milieu peuvent être utilisées pendant 5 à 7 jours.

Si la méthode du milieu coulé en boîtes de Pétri est utilisée, ajouter la matière à tester ou sa dilution dans la boîte vide, recouvrir avec le milieu, agiter doucement afin de mélanger les composants et attendre que le milieu se solidifie complètement.

Pour préparer des géloses inclinées en tubes, ajouter une quantité appropriée de milieu liquéfié et refroidi entre 48 et 50 °C à l'intérieur des tubes, et laisser se solidifier avec l'inclinaison requise. Les tubes peuvent être utilisés pendant 2 à 3 semaines, dans la mesure où ils sont fermés hermétiquement et conservés dans l'obscurité à température ambiante, ou entre 2 et 8 °C.

Avant utilisation, les surfaces du milieu ne doivent pas être excessivement mouillées.

Ne pas liquéfier plus d'une fois un milieu livré en flacons. Ne pas permettre aux excédents de se solidifier et de se liquéfier une deuxième fois, car un réchauffement répété détériore les composants du milieu et altère la performance microbiologique.

Types d'échantillons

Le milieu non complémenté, coulé en boîtes de Pétri est utilisé dans un grand nombre de procédures, notamment pour des tests pharmaceutiques. En microbiologie clinique, il ne doit

pas être utilisé comme milieu d'isolement de pathogènes à partir d'échantillons cliniques, sauf s'il a été complété avec du sang (p. ex. 5 % de sang de mouton). Complémentée avec 5 % de sang, la boîte peut être utilisée universellement pour réaliser l'isolement primaire de pathogènes, à partir de tous les types d'échantillons. Consulter les publications citées en référence pour des informations sur le prélèvement et le traitement des échantillons.^{4,10} Le milieu en tubes inclinés ne doit pas être utilisé directement avec des échantillons cliniques mais doit uniquement servir de milieu de croissance et de conservation pour les cultures bactériennes.

Mode opératoire du test

Avant d'être utilisées, les surfaces gélosées du milieu préparé (cultivé en boîtes de Pétri ou en tubes) doivent présenter un aspect lisse et humide, mais sans excès d'humidité, car cela pourrait provoquer l'apparition d'une croissance agglomérée.

Consulter les publications citées en référence appropriées pour plus d'informations sur les méthodes spécifiques.^{2,6,7}

Boîtes complémentées avec du sang : Strier le milieu avec l'échantillon dès que possible après sa réception au laboratoire. La boîte d'étalement sert principalement à isoler des cultures pures à partir d'échantillons contenant une flore mixte. Si le prélèvement est mis en culture directement à partir d'un écouvillon, rouler l'écouvillon sur une petite partie de la gélose au niveau du bord de la boîte, puis strier la gélose à partir de cette zoneensemencée. Incuber les boîtes ou les tubes conformément aux conditions choisies.

- Si le milieu est utilisé avec des échantillons cliniques, incuber pendant 18 à 48 h (ou plus longtemps si nécessaire) à 35 ± 2 °C, ou comme il convient pour les microorganismes concernés.
- Si le milieu est utilisé en contrôle sanitaire, incuber entre 30 et 35 °C, jusqu'à 5 jours maximum.

Pour l'utiliser avec des composants pharmaceutiques, consulter les publications citées en référence.^{1,2}

Le milieu cultivé en tubes inclinés est utilisé pour la culture et le prolongement de cultures bactériennes. Strier la souche directement, ou après suspension dans de l'eau stérilisée ou dans une solution saline, sur la totalité de la surface inclinée. Incuber l'isolat comme il convient. Pendant l'incubation, les bouchons peuvent être desserrés légèrement afin d'assurer une ventilation. Refermer hermétiquement après l'incubation et pendant le stockage.

Résultats

A l'issue de l'incubation, les boîtes peuvent présenter une zone de croissance agglomérée. La procédure de striation étant, en réalité, une technique de « dilution », des nombres décroissants de microorganismes sont progressivement déposés dans les zones striées. Par conséquent, une ou plusieurs de ces zones doivent présenter les colonies isolées des microorganismes contenus dans l'échantillon. En outre, la croissance de chaque microorganisme peut être évaluée de façon semi-quantitative sur la base de la croissance observée dans chacune des zones striées.

- Méthode du milieu coulé en boîtes de Pétri : Consulter les publications citées en référence appropriées.^{1,2,6,7}

Dans la mesure où elles ont étéensemencées avec un inoculum approprié, les géloses inclinées présentent une croissance sur la totalité de leur surface. Les tubes peuvent être réfrigérés pendant plusieurs semaines sans perte de viabilité de la culture. Le temps de survie dépend des souches spécifiques.

Le nombre et les types de microorganismes se développant sur le milieu terminé, préparé à partir de **BD Tryptic Soy Agar** (milieu en flacons), sont très importants. C'est pourquoi aucun détail ne peut être fourni ici quant à leur morphologie. Consulter les publications citées en référence.^{4,9,10}

Pour obtenir une différenciation et une identification approfondie des microorganismes, effectuer des repiquages appropriés à partir des isolats obtenus sur les différents milieux.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

La **BD Tryptic Soy Agar** est utilisée dans plusieurs procédures de microbiologie industrielle, p. ex. dans les procédures de dénombrement des microorganismes ainsi qu'en microbiologie alimentaire et en microbiologie de l'eau.^{1-3,6,7}

Non complétée, la Tryptic Soy Agar est utilisée pour la culture de nombreuses bactéries moins exigeantes comme les *Enterobacteriaceae*, bâtonnets à Gram négatif non fermentants (*Pseudomonas* et autres), entérocoques, staphylocoques, bactéries sporulées (*Bacillus* et genres connexes), et d'autres microorganismes dont les besoins en facteurs de croissance sont semblables. Ce milieu ne convient pas à l'isolement et à la culture de bactéries très exigeantes, telles que *Neisseria* ou *Haemophilus* spp., ou de microorganismes à besoins nutritionnels spécifiques, et n'est pas le mieux adapté à l'isolement des microorganismes anaérobies stricts et exigeants. Par conséquent, son utilisation en microbiologie clinique est limitée à certains tests, p. ex. pour réaliser la différenciation des *Haemophilus* spp. au moyen de bandelettes avec facteurs X, V, et XV.⁸

La Tryptic Soy Agar complétée avec du sang (p. ex. 5 % sang de mouton) est fréquemment utilisée en microbiologie clinique comme milieu d'isolement primaire des bactéries aérobies. Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.^{3-5, 8-10}

La Tryptic Soy Agar non complétée ne contient pas de composés capables de neutraliser activement les désinfectants ou les agents conservateurs. Si des matériaux contenant de tels composés ou si des surfaces désinfectées au préalable doivent être évalués, il est recommandé d'utiliser de la Tryptic Soy Agar avec de la lécithine et du polysorbate ou de compléter le milieu de manière appropriée.

REFERENCES

1. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. 1994. The U.S. Pharmacopeia 24/The national formulary 19-1999. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md.
2. Council of Europe, 2002. European Pharmacopoeia, 4th edition, and Supplement 4.2. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France.
3. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore.
4. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
5. Nash, P., and M.M. Krenz. 1991. Culture media. In: A. Balows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy (ed.), Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Eaton, A.D., L.S. Clesceri, and A.E. Greenberg (ed.). 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
7. Downes, F.P., and K. Ito (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
8. Campos, J.M. 1995. Haemophilus. In: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Chapin, K.C., and T.-L. Lauderdale. 2003. Reagents, stains, and media: bacteriology. 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.
10. 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.
11. NCCLS M2-A7. 1996. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media - 2nd edition; approved standard. National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Wayne, PA, USA.

CONDITIONNEMENT

BD Tryptic Soy Agar (milieux en flacons partiellement complétés)

N° réf. 256665	10 unités par carton	Volume de remplissage 100 mL ; flacon à sirop de 250 mL
N° réf. 257105	12 unités par carton	Volume de remplissage 250 mL ; flacon plat de 500 mL
N° réf. 257106	10 unités par carton	Volume de remplissage 500 mL ; flacon à sirop de 500 mL
N° réf. 257240	4 unités par carton	Volume de remplissage 400 mL ; flacon de laboratoire de 500 mL

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Pour plus d'informations, contacter le représentant local de BD.



BD Diagnostic Systems
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

BD Diagnostic Systems Europe
Becton Dickinson France SA
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix/France
Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 <http://www.bd.com>

BD and BD logo are trademarks of Becton, Dickinson and Company.
Bacto is a trademark of Difco Laboratories, division of Becton, Dickinson and Company.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
© 2003 Becton, Dickinson and Company