

PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE (Facultatif)

I INTRODUCTION

La gélose TSI Agar (Triple Sugar Iron Agar) est un milieu utilisé pour différencier les organismes entériques Gram négatifs sur la base de leur capacité de fermentation du dextrose, du lactose et de la saccharose et de leur capacité de production de sulfures.

II MODE OPERATOIRE DU TEST

1. Ensemencer des échantillons représentatifs avec les cultures répertoriées ci-dessous.
 - a. Utiliser des cultures de gélose inclinée **Trypticase** Soy Agar âgées de 18 à 24 h. Ensemencer les tubes au moyen d'une aiguille à ensemencer en piquant le culot et en striant la surface de la pente par mouvements de va-et-vient.
 - b. Incuber les tubes, bouchons desserrés, en atmosphère aérobie, à une température de 35 ± 2 °C.
2. Examiner les tubes au bout de 18 à 24 h afin de contrôler la croissance et les réactions.
3. Résultats attendus

	Pente	Culot	Gaz	H ₂ S
* <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Acide	Acide	+	–
* <i>Salmonella enterica</i> sous-esp. <i>enterica</i> sérotypage Typhimurium ATCC 14028	Alcalin	Acide	+/-	+
* <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Alcalin	Acide	–	–
* <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Alcalin	Alcalin	–	–

*Souche recommandée pour le Contrôle de qualité réalisé par l'utilisateur.

REMARQUE : Ce milieu n'est pas soumis aux tests de Contrôle Qualité par l'utilisateur selon CLSI M22-A3.

III CONTROLE DE QUALITE SUPPLEMENTAIRE

1. Examiner les tubes comme décrit à la rubrique « Détérioration du produit ».
2. Inspecter visuellement des tubes représentatifs pour s'assurer qu'aucun défaut physique ne peut interférer avec leur utilisation.
3. Déterminer le pH par potentiométrie à température ambiante afin de respecter la spécification de $7,3 \pm 0,2$.
4. Incuber des tubes représentatifs non ensemencés entre 20 et 25 °C et 30 et 35 °C, et les examiner après 7 jours pour déceler une contamination microbienne éventuelle.

INFORMATIONS PRODUIT

IV APPLICATION

La TSI Agar (gélose TSI) est utilisée pour différencier les bacilles entériques Gram négatifs sur la base de leur capacité de fermentation des glucides et de production d'acide sulfhydrique.

V RESUME ET EXPLICATION

La TSI Agar est utilisée pour déterminer la fermentation de glucides et la production d'acide sulfhydrique pour identification des bacilles Gram négatifs.^{1,2}

Hajna a développé la formulation de la gélose TSI Agar en ajoutant de la saccharose à la formulation de la gélose Kligler Iron Agar, qui contient un sucre double (dextrose et lactose).³ L'ajout de saccharose a accru la sensibilité du milieu en facilitant la détection des bacilles fermentant la saccharose et celle des fermentants de lactose et/ou de dextrose.

La fermentation des glucides est révélée par la présence de gaz et par un changement visible de couleur (du rouge au jaune) de l'indicateur de pH, le rouge de phénol. La production d'acide sulfhydrique est indiquée par la présence d'un précipité qui noircit le milieu dans le culot du tube.

VI PRINCIPES DE LA METHODE

La gélose TSI Agar contient trois sucres (dextrose, lactose et saccharose), du rouge de phénol pour détecter la fermentation des glucides, et du sulfate ferreux pour détecter la production d'acide sulfhydrique (indiquée par le noircissement du culot dans le tube).

La fermentation des glucides est révélée par la présence de gaz et par un changement de couleur (du rouge au jaune) de l'indicateur de pH. Pour faciliter la détection des organismes fermentant uniquement le dextrose, la concentration de dextrose représente un dixième seulement de celle du lactose ou de la saccharose. La faible quantité d'acide produit dans la pente du tube pendant la fermentation du dextrose s'oxyde rapidement. Le milieu reste alors rouge, ou retrouve un pH alcalin. En revanche, la réaction acide (jaune) se maintient dans le culot du tube car celui-ci subit une tension en oxygène moins importante.

Une fois la faible quantité de dextrose épuisée, les organismes qui le peuvent commencent à utiliser le lactose ou la saccharose.⁴

Pour favoriser l'état alcalin de la pente, laisser l'air passer librement en ne refermant pas totalement les tubes. Dans un tube hermétiquement clos, une réaction acide (provoquée uniquement par la fermentation du dextrose) affecte aussi la pente.

VII REACTIFS

TSI Agar

Formule approximative* par litre d'eau purifiée

Digestion pancréatique de caséine	10,0	g
Digestion peptique de tissu animal	10,0	g
Chlorure de sodium	5,0	g
Lactose	10,0	g
Saccharose	10,0	g
Dextrose	1,0	g
Sulfate d'ammonium ferreux	0,2	g
Thiosulphate de sodium	0,2	g
Rouge de phénol	0,025	g
Gélose	13,0	g

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

Avertissements et précautions

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Ouvrir avec précaution les tubes étroitement bouchés pour ne pas risquer d'être blessé par un bris de verre.

Prendre les précautions habituelles contre les dangers microbiologiques. Avant de les éliminer, stériliser à l'autoclave les tubes préparés, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé.

Instructions pour la conservation

Des réception, conserver les tubes dans l'obscurité, à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Ne pas ouvrir prématurément. Maintenir à l'abri de la lumière. Les milieux en tube conservés conformément aux instructions jusqu'au moment de leur utilisation peuvent êtreensemencés jusqu'à la date de péremption indiquée et incubés pendant les durées recommandées. Laisser le milieu s'équilibrer à température ambiante avant de l'ensemencer.

Détérioration du produit

Ne pas utiliser les tubes s'ils présentent des signes de contamination microbienne, décoloration ou dessiccation, ou d'autres signes de détérioration.

VIII PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons adaptés à la mise en culture peuvent être manipulés selon différentes techniques. Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.^{2,5} Prélever les échantillons avant l'administration des agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

IX PROCEDURE

Matériaux fournis

TSI Agar Slants

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.

Lors de l'ensemencement, veiller à ne toucher que le centre d'une colonie isolée dans un milieu entérique en boîte de Pétri avec une aiguille froide et stérile. Piquer le milieu dans le culot du tube, puis strier la surface de la pente par mouvements de va-et-vient. Etudier séparément plusieurs colonies de chaque boîte primaire, car des infections mixtes peuvent survenir.

Incuber à 35 °C sans serrer les bouchons. Au bout de 18 à 24 h, vérifier la fermentation des glucides ainsi que la production de gaz et d'acide sulfhydrique. Ces réactions peuvent se combiner de toutes les manières. Ne pas incuber pendant plus de 24 h, car la réaction acide dans la pente des fermentants de lactose et de saccharose peut s'inverser pour devenir alcaline.

Contrôle de qualité par l'utilisateur

Voir « Procédures de contrôle de qualité ».

Chaque lot de milieu a été testé à l'aide des organismes de contrôle de qualité adaptés et ces tests sont conformes aux spécifications du produit, ainsi qu'aux normes CLSI, lorsqu'elles sont applicables. Comme toujours, les tests de CQ doivent être réalisés conformément aux réglementations locales, régionales, nationales ou internationales, aux exigences d'accréditation et/ou aux protocoles de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement.

X RESULTATS

Comparer les réactions produites par l'isolat inconnu à celles obtenues par les organismes de contrôle connus.

La fermentation des glucides est révélée par une coloration jaune du milieu. Si le milieu du culot du tube devient jaune (acide), mais que celui de la pente devient rouge (alcalin), cela signifie que l'organisme testé fermente uniquement le dextrose (glucose).

Une couleur jaune (acide) dans la pente et dans le culot indique que l'organisme testé fermente le dextrose, le lactose et/ou la saccharose.

Une couleur rouge (réaction alcaline) dans la pente et le culot indique que l'organisme testé est un non-fermentant.

La production d'acide sulfhydrique est révélée par un précipité noir dans le culot du tube.

La production de gaz est indiquée par la division et la fissuration du milieu.

Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.^{2,5-7}

XI LIMITES DE LA PROCEDURE

Certains organismes peuvent produire de l'acide sulfhydrique avec la gélose Kligler Iron Agar, mais non avec la gélose TSI Agar, car l'utilisation de saccharose dans cette dernière supprime le mécanisme enzymatique entraînant la production de H₂S. Plus particulièrement, la *Salmonella* productrice de H₂S et certains membres de la famille des *Enterobacteriaceae* peuvent s'avérer H₂S-positives avec la gélose TSI Agar.¹

Comme avec la Kligler Iron Agar, les organismes qui produisent de l'acide sulfhydrique avec la TSI Agar peuvent générer un précipité noir (sulfure de fer) abondant au point de masquer totalement l'acidité produite dans le culot. Cependant, en cas de réduction du H₂S, une condition acide (non nécessairement observable) se produit dans le culot, et doit être consignée comme telle.¹

Pour procéder à l'identification, les organismes doivent se trouver en culture pure. Des tests morphologiques, biochimiques et/ou sérologiques doivent être effectués pour l'identification finale. Pour plus d'informations, et pour connaître les procédures recommandées, consulter les publications citées en référence.^{2,5-7}

XII CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Tous les lots de TSI Agar Slants sont soumis à des tests en usine permettant d'évaluer les caractéristiques de leurs performances. Des échantillons représentatifs du lot sont testés avec des cultures **Trypticase Soy Agar** d'*Escherichia coli* (ATCC 25922), de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) et de *Shigella flexneri* (ATCC 12022) par striage de la pente et piqûre du culot à l'aide d'une aiguille à ensemencer. Les tubes sont incubés, avec les bouchons desserrés, à 35 ± 2 °C. La croissance et les réactions sont évaluées au bout de 18 à 24 h d'incubation. Tous les organismes présentent une croissance modérée à forte. La pente du tube ensemencé d'*E. coli* a une réaction acide, tandis que celle de tous les autres tubes ensemencés ont une réaction alcaline. *S. flexneri* produit une réaction acide dans le culot et *P. aeruginosa* une réaction alcaline. *E. coli* produit de l'acide et du gaz dans le culot. *Salmonella* Typhimurium produit une réaction acide dans le culot ainsi qu'un noircissement du milieu. Du gaz peut éventuellement être présent.

XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
221038	BD BBL TSI Agar Slants, boîte de 10 tubes de taille K
221039	BD BBL TSI Agar Slants, carton de 100 tubes de taille K

XIV REFERENCES

1. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore.
2. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
3. Hajna, A.A. 1945. Triple-sugar iron agar medium for the identification of the intestinal group of bacteria. J. Bacteriol. 49:516-517.
4. Baron, E.J., L.R. Peterson and S.M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc.
5. 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.
6. Ewing, W.H. 1985. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
7. 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.

Service et assistance technique de BD Diagnostics : contacter votre représentant local de BD ou consulter le site www.bd.com/ds.



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.

BD, BD Logo, and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD