



**BBL Thioglycollate Medium,
Enriched (with Vitamin K₁ and Hemin),
with Calcium Carbonate**
L007510 • Rev. 05 • Janvier 2011



PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE

I INTRODUCTION

Le Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate est un milieu à usages multiples pour la culture des microorganismes exigeants et non exigeants, et pouvant également servir à constituer une souche de culture.

II MODE OPERATOIRE DU TEST

1. Réduire le milieu en faisant bouillir* les tubes avec les bouchons desserrés. Une fois l'ébullition atteinte, resserrer immédiatement les bouchons et laisser les tubes refroidir jusqu'à température ambiante.
***REMARQUE :** Il n'est pas recommandé d'utiliser un four à micro-ondes.
2. Préparation des inoculum
Utiliser une culture âgée de 48 à 72 h issue de Enriched Thioglycollate Medium, de Chopped Meat Medium, ou de colonies provenant d'une boîte de Pétri CDC Anaerobe 5% Sheep Blood Agar transférée dans un tube contenant du Enriched Thioglycollate Medium préréduit et dont le niveau de turbidité a été ajusté à un niveau comparable à celui du standard McFarland 0,5.
3. Utiliser une anse calibrée stérile (0,01 mL) pour ensemercer les tubes avec l'inoculum normalisé pour chaque organisme.
4. Incuber les cultures, avec les bouchons resserrés, en atmosphère aérobie, à une température de 35 ± 2 °C.
5. Au bout de 18 à 24 h et de 42 à 48 h, examiner les tubes afin de contrôler la croissance.
6. Résultats attendus

**Peptostreptococcus anaerobius*..... Croissance

ATCC 27337

**Bacteroides vulgatus* Croissance

ATCC 8482

**Clostridium perfringens* Croissance

ATCC 13124

Clostridium novyi A Croissance

ATCC 7659

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

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 $7,0 \pm 0,2$.
4. Incuber des tubes représentatifs non ensemençés 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

Le Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate (milieu au thioglycolate enrichi avec carbonate de calcium) est un milieu à usages multiples utilisé lors de procédures qualitatives de culture de microorganismes exigeants et non exigeants, y compris les bactéries aérobies et anaérobies, à partir de divers matériaux cliniques et non cliniques. Il peut aussi servir à constituer une souche de culture.

V RESUME ET EXPLICATION

Le Enriched Thioglycollate Medium est un Thioglycollate Medium de BBL sans l'indicateur - 135C, et complété en vitamine K₁ et en hémine.¹⁻³ Ce bouillon enrichi est recommandé pour l'isolement et la culture des microorganismes exigeants ou à croissance lente

strictement anaérobies, présents dans les matériaux cliniques.^{4,5} Son utilisation est également recommandée pour l'isolement et la culture d'une grande variété de microorganismes aérobies et anaérobies facultatifs. Le milieu est préparé en atmosphère anaérobie et livré en tubes munis de bouchons à vis, conformément aux recommandations du CDC.⁴ Il a été démontré que certains organismes anaérobies ont besoin de vitamine K₁ et d'hémine pour se développer.^{6,7}

Le carbonate de calcium favorise la conservation des souches, car il neutralise les acides produits lors de la croissance.⁸

L'isolement des microorganismes contenus dans les matériaux cliniques exige souvent l'utilisation d'un bouillon enrichi, en plus des milieux sélectifs, différentiels et non sélectifs en boîtes de Pétri normalement utilisés pour l'isolement primaire. L'utilisation d'un milieu « de secours » liquide diminue le risque de non-détection d'un agent étiologique faiblement représenté et à croissance lente en boîte de Pétri qui serait sensible à des agents sélectifs ou à des mauvaises conditions d'incubation telle qu'une anaérobiose insuffisante pour une croissance optimale des anaérobies stricts.

VI PRINCIPES DE LA METHODE

La caséine et les peptones de soja fournissent les aminoacides et d'autres substances azotées nécessaires à la croissance bactérienne. L'extrait de levure est source de complexe vitaminique B. Le chlorure de sodium contient les ions essentiels. Le dextrose est une source d'énergie.

L'action réductrice du thioglycolate de sodium et du sulfite de sodium lie l'oxygène moléculaire, et l'élimine ainsi du milieu, ce qui maintient un faible niveau de potentiel d'oxydo-réduction (Eh).⁹ Une petite quantité de gélose est ajoutée pour ralentir l'absorption d'oxygène en diminuant les courants de convection du milieu.⁹

Certaines souches de *Prevotella melaninogenica*⁶ ont besoin de vitamine K₁ pour se développer. En outre, cette vitamine favorise la croissance de plusieurs souches appartenant aux espèces *Bacteroides* et celle d'organismes Gram positifs non sporulés.¹⁰ L'hémine fournit le facteur X, qui stimule la croissance de nombreux microorganismes.

L'incorporation de carbonate de calcium est recommandée : sans cela, les organismes exigeants pourraient croître puis entrer dans une phase de mortalité massive. Le carbonate de calcium contribue à neutraliser l'acide produit lors de la phase de croissance.^{8,11}

VII REACTIFS

Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate

Formule approximative* par litre d'eau purifiée

Digestion pancréatique de caséine	12,0	g
Digestion papaïque de semoule de soja	3,0	g
Dextrose	6,0	g
Extrait de levure	5,0	g
Chlorure de sodium	2,5	g
Thioglycolate de sodium	0,5	g
Gélose	0,7	g
L-Cystine	0,25	g
Sulfite de sodium	0,1	g
Hémine	0,005	g
Vitamine K ₁	0,001	g
Eclat de marbre	1 par tube	

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

Avertissements et précautions

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Il faut user de précautions lorsque l'on rend directement les résultats de la coloration Gram et d'autres colorations microbiologiques, obtenus sur des échantillons de tissus préparés avec ce milieu, du fait de la présence possible d'organismes non viables dans ce milieu.

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

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 »¹²⁻¹⁵ et les consignes en vigueur dans

l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques. Après utilisation, stériliser à l'autoclave les tubes préparés, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé avant de les éliminer.

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.^{16,17} Prélever les échantillons avant l'administration des agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

IX PROCEDURE

Matériaux fournis

Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate

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.

Les milieux liquides pour l'incubation anaérobie doivent être réduits avant l'ensemencement. Pour cela, placer les tubes, bouchons desserrés, dans des conditions anaérobies pendant 18 à 24 h avant de les utiliser. Le système anaérobie **BD GasPak EZ** est une méthode efficace et simple pour obtenir des conditions anaérobies adaptées. Les milieux liquides peuvent aussi être réduits juste avant leur utilisation : les faire bouillir*, bouchons desserrés, et les laisser refroidir à température ambiante, bouchons resserrés, avant l'ensemencement.

Ensemencer l'échantillon dans le milieu choisi dès son arrivée au laboratoire. Les tubes de milieux contenant des échantillons liquides doivent êtreensemencés avec une ou deux gouttes de l'échantillon. Les biopsies servant à la culture des microorganismes doivent être hachées et dilacérées dans du bouillon réduit stérile comme l'Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate. L'ensemencement est ensuite exécuté de la même manière que pour les échantillons liquides. Les échantillons prélevés par écouvillonnage peuvent être incorporés dans le bouillon après l'ensemencement des milieux en boîtes de Pétri. Il est aussi possible de « nettoyer » l'écouvillon dans un petit volume de bouillon stérile pré-réduit, et d'utiliser ce bouillon pour ensemenecer le milieu, en procédant de la même façon qu'avec les échantillons liquides.

Les échantillons contenant ou présumés contenir des organismes anaérobies stricts doivent êtreensemencés près du fond du tube. Incuber les cultures, avec les bouchons desserrés, en atmosphère aérobie, à une température de 35 ± 2 °C ou autre température adaptée.

Les cultures en bouillon doivent être conservées au moins une semaine avant d'être déclarées négatives.⁸

***REMARQUE :** Il n'est pas recommandé d'utiliser un four à micro-ondes.

Contrôle de qualité par l'utilisateur

Voir « Procédures de contrôle de qualité ».

Effectuer les contrôles de qualité conformément à la réglementation nationale et/ou internationale, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de

consulter les directives CLSI et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

Une seule électrode d'une taille suffisamment petite pour pénétrer dans les tubes devrait être utilisée pour déterminer potentiométriquement le pH des milieux en tubes. L'extrémité de l'électrode devrait arriver sous la surface du bouillon.

X RESULTATS

La présence de turbidité à l'intérieur des tubes de bouillon tels que ceux contenant du Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate (par rapport à un échantillon de contrôle non ensemencé) est un signe de croissance.

Si une certaine croissance est constatée, effectuer une coloration de Gram sur les cultures et repiquer en milieux sélectifs et non sélectifs en boîtes de Pétri. Si la présence d'organismes anaérobies est présumée, repiquer également dans des milieux anaérobies en boîtes de Pétri adaptées.

XI LIMITES DE LA PROCEDURE

La population d'anaérobies peut être dépassée par la prolifération d'organismes facultatifs à croissance plus rapide. Si aucune croissance n'est constatée à l'issue de l'examen visuel du milieu en boîte de Pétri, effectuer une coloration de Gram du bouillon. Pour isoler des anaérobies, ne jamais procéder exclusivement par cultures en bouillon. Certains anaérobies peuvent être inhibés par les produits ou acides métaboliques générés par les populations d'anaérobies facultatives à croissance plus rapide.⁸

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.¹⁶⁻¹⁸

Les milieux de culture contiennent parfois des organismes morts provenant des éléments composant le milieu, qui peuvent apparaître sous la forme de trainées dans le milieu de culture. Les réactifs de coloration, l'huile d'immersion, les lames de verre et les échantillons utilisés pour l'ensemencement constituent d'autres sources d'organismes morts qui deviennent visibles après une coloration de Gram. S'il existe un doute concernant la coloration de Gram, la culture doit être réincubée pendant une heure ou deux et le test répété avant qu'un compte rendu ne soit donné.

XII CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Tous les lots d'Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate sont soumis à des tests en usine permettant d'évaluer les caractéristiques de leurs performances. Avant l'ensemencement, des échantillons représentatifs du lot sont réduits. Pour cela, ils sont portés à ébullition dans un bain-marie pendant 10 minutes au moins, puis laissés à refroidir. A l'aide d'une anse calibrée (0,01 mL), les tubes sont ensemencés avec des cultures ajustées au standard de turbidité McFarland 0,5. Les inoculum de *Porphyromonas levii* (ATCC 29147), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) et *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) sont prélevés à partir de colonies issues de boîtes de Pétri CDC Anaerobe 5% Sheep Blood Agar. Leur concentration est ensuite ajustée dans un milieu Thioglycollate Medium, Enriched pré-réduit. L'inoculum de *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) est prélevé dans un milieu Thioglycollate Medium, Enriched, et celui de *C. novyi* (ATCC 7659) dans un Chopped Meat Glucose Broth, PR II. Les tubes sont ensemencés sous la surface des bouillons, aussi profondément que possible à l'intérieur du milieu. Les bouchons sont resserrés immédiatement après l'ensemencement, puis les tubes sont incubés en atmosphère aérobie à 35 ± 2 °C. Après 18 à 24 h et 42 à 48 h d'incubation, la croissance est contrôlée dans les tubes. Au bout de 48 h, tous les organismes présentent des signes de croissance, de quelques traces à une croissance forte.

XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
297264	BBL Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate, carton de 100 tubes de taille K

XIV REFERENCES

1. Brewer, J.H. 1940. A clear liquid medium for the "aerobic" cultivation of anaerobes. *J. Bacteriol.* 39:10.
2. Vera, H.D. 1944. Comparative study of materials suitable for the cultivation of clostridia. *J. Bacteriol.* 47:59-65.
3. Dowell, V.R., Jr., and T.M. Hawkins. 1987. Laboratory methods in anaerobic bacteriology. CDC laboratory manual. HHS Publication No. (CDC) 87-8272. Centers for Disease Control, Atlanta.
4. Dowell, V.R., Jr., G.L. Lombard, F.S. Thompson, and A.Y. Armfield. 1977. Media for isolation, characterization, and identification of obligately anaerobic bacteria. CDC laboratory manual. Center for Disease Control, Atlanta.
5. Forbes, B.A., and P.A. Granato. 1995. Processing specimens for bacteria, p. 265-281. *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.
6. Gibbons, R.J. and J.B. MacDonald. 1960. Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Bacteriol.* 80:164-170.
7. Wilkins, T.D., S.L. Chalgren, F. Jimenez-Ulate, C.R. Drake, Jr., and J.L. Johnson. 1976. Inhibition of *Bacteroides fragilis* on blood agar plates and reversal of inhibition by added hemin. *J. Clin. Microbiol.* 3:359-363.
8. Reischelderfer, C., and J.I. Mangels. 1994. Culture media for anaerobes, p. 2.3.1-2.3.8. *In* H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol.1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore.
10. Finegold, S.M., V.L. Sutter, H.R. Attelberg, and J.E. Rosenblatt. 1974. Isolation of anaerobic bacteria, p. 365-375. *In* E.H. Lennette, G.H. Spaulding, and J.P. Truant (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Vera, H.D. 1944. A comparative study of materials suitable for the cultivation of clostridia. *J. Bacteriol.* 47:59-70.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
13. 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.
14. U.S. Department of Health and Human Services. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 5th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
15. 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.
16. 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, Washington, D.C.
17. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
18. 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.



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA
800-638-8663
www.bd.com/ds



Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo, BBL and GasPak are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2011 BD