



BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics

L007445 • Rev. 11 • Avril 2015



PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE

I INTRODUCTION

Le Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics (Campy Thio) est un milieu de conservation pour les échantillons présumés contenir l'espèce *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, avant l'ensemencement d'un milieu solide.

II MODE OPERATOIRE DU TEST

A. TEST 1 : *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*

1. Préparer un standard McFarland n° 1 à partir d'une culture de *C. jejuni* subsp. *jejuni* sur **Trypticase** Soy Agar additionnée de 5 % de sang de mouton (TSA II).
2. Diluer la culture standardisée dans du **Trypticase** Soy Broth jusqu'à obtention d'une concentration à 10^{-3} .
3. Ensemencer 0,1 mL de culture diluée dans un tube contenant du Campy Thio. Vortexer.
4. A partir du tube de Campy Thio ensemencé, ensemencer immédiatement (écouvillonnage puis striation) une boîte de Pétri de TSA II. Etiqueter la boîte « avant réfrigération ». Incuber la boîte à 42 ± 2 °C dans un récipient **GasPak** fonctionnant avec une enveloppe **CampyPak**, ou dans le système **GasPak** EZ Campy. Au bout de 36 à 48 h, vérifier le taux de croissance de *C. jejuni* subsp. *jejuni*.
5. Mettre immédiatement à réfrigérer pour la nuit (16 à 24 h) les tubes de Campy Thio ensemencés, à une température comprise entre 2 et 8 °C. NE PAS UTILISER d'enveloppe ou de récipient **CampyPak**.
6. Après une nuit de réfrigération, repiquer les tubes de Campy Thio ensemencés. Effectuer un écouvillonnage suivi d'un ensemencement par striation dans une boîte de Pétri de TSA II. Etiqueter la boîte « après réfrigération ».
7. Incuber la boîte à 42 ± 2 °C dans un récipient **GasPak** fonctionnant avec une enveloppe **CampyPak** ou dans le système **GasPak** EZ Campy.
8. Au bout de 36 à 48 h, vérifier le taux de croissance.

B. TEST 2 : Flore mélangée

1. Préparer un standard McFarland n° 1 à partir d'une culture de flore mélangée incubée pendant 18 à 24 h (constituée des espèces *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Candida albicans*, mélangées au ratio 1/1/1).
2. Préparer des dilutions à 10^{-4} et 10^{-5} à partir de cette flore mélangée standardisée.
3. Ensemencer par étalement une boîte de Pétri de TSA II avec 0,1 mL prélevé dans la dilution à 10^{-5} .
4. a. Ensemencer un tube de Campy Thio avec 0,1 mL prélevé dans la dilution à 10^{-4} . Vortexer.
b. Ensemencer immédiatement une boîte de Pétri de Campylobacter Agar with 5 Antimicrobics additionnée de 10 % de sang de mouton (Campy-BAP) et une boîte de Pétri de TSA II, avec 0,1 mL prélevés dans le tube de Campy Thio ensemencé, puis étaler uniformément à l'aide d'un râteau de verre stérile. Etiqueter les boîtes « avant réfrigération ».
5. Incuber les boîtes à 42 ± 2 °C dans un récipient **GasPak** fonctionnant avec une enveloppe **CampyPak** ou dans le système **GasPak** EZ Campy. Au bout de 36 à 48 h, vérifier les taux de croissance.
6. Mettre immédiatement à réfrigérer pour la nuit le tube de Campy Thio (16 à 24 h), à une température comprise entre 2 et 8 °C. NE PAS UTILISER d'enveloppe ou de récipient **CampyPak**.
7. Après une nuit de réfrigération, repiquer en plaçant l'embout d'une pipette environ 2 cm sous la surface du Campy Thio et prélever un échantillon en continu, jusqu'à ce que l'embout remonte lentement jusqu'à la surface. A l'aide d'un râteau de verre, ensemencer

par étalement une Campy-BAP et une boîte de Pétri de TSA II avec 0,1 mL. Etiqueter les boîtes « après réfrigération ».

8. Incuber les boîtes à 42 ± 2 °C dans un récipient **GasPak** fonctionnant avec une enveloppe **CampyPak** ou dans le système **GasPak EZ Campy**.
9. Au bout de 36 à 48 h, vérifier les taux de croissance.

C. Résultats attendus

<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> *ATCC™ 33291	Récupération des échantillons « après réfrigération ». La croissance des échantillons cultivés dans la boîte de TSA II ne doit pas être inférieure de plus d'un point de croissance à celle de l'échantillon « avant réfrigération ».
---	---

Culture de flore mélangée constituée à 1/1/1 des ingrédients suivants :

* <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	La croissance de la flore mélangée doit être inhibée (inhibition partielle à totale) dans la boîte de Campy-BAP. La croissance (en nombre) de la culture mélangée (10^4) du tube Campy Thio sur TSA II doit être plus faible que celle de la culture mélangée (10^5) du tube de dilution sur TSA II.
* <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	
* <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	

*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. 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

Le Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics (milieu au thioglycolate campylobacter à cinq agents antimicrobiens) est recommandé comme milieu de conservation des échantillons présumés contenir des *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* lorsque les conditions ne permettent pas un ensemencement immédiat de gélose Campylobacter Agar with 5 Antimicrobics additionnée de 10 % de sang de mouton.

V RESUME ET EXPLICATION

En 1972, Dekeyser *et al.* sont parvenus à isoler l'espèce *C. jejuni* à partir de selles de patients souffrant de diarrhées et de gastro-entérites aiguës, grâce à une technique de filtrage et à un milieu sélectif contenant des agents antimicrobiens destinés à éliminer la flore entérique normale.¹ En 1977, Skirrow a décrit un milieu de culture sélectif contenant trois agents antimicrobiens.² Blaser *et al.* ont réussi à isoler *C. jejuni* en pratiquant un ensemencement direct d'échantillons fécaux sur un milieu gélosé contenant quatre agents antimicrobiens et en ensemençant ce milieu avec des écouvillonnages fécaux réfrigérés pendant 8 h dans du bouillon de thioglycolate (gélose à 0,16 %) contenant les quatre mêmes agents antimicrobiens.^{3,4} Un cinquième agent antimicrobien, la céfalotine, a été incorporée ultérieurement, afin d'inhiber l'espèce non pathogène *C. fetus* subsp. *fetus*.⁴

Le Campylobacter Thioglycollate Medium est recommandé comme milieu de conservation lorsque les équipements nécessaires à la striation et à l'incubation ne sont pas immédiatement disponibles, lorsque des chiffres faibles sont attendus en raison du délai nécessaire au transport des échantillons jusqu'au laboratoire, ou lorsque le stade aigu de la maladie est dépassé.^{5,6}

Pour connaître les dernières études taxinomiques, se reporter aux publications de Nachamkin.⁶

VI PRINCIPES DE LA METHODE

Le Campylobacter Thioglycollate Medium est un milieu de conservation sélectif recommandé pour isoler *C. jejuni* subsp. *jejuni* des échantillons cliniques. L'incorporation d'agents antimicrobiens, c'est-à-dire d'amphotéricine B, de céfalotine, de polymyxine B, de triméthoprim et de

vancomycine, associée à la réfrigération, inhibe la multiplication de la flore microbienne normale dans les échantillons fécaux, ce qui facilite l'isolement de *C. jejuni* subsp. *jejuni*.

VII REACTIFS

Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics

Formule approximative* par litre d'eau purifiée

Digestion pancréatique de caséine	17,0	g
Digestion papaique de semoule de soja	3,0	g
Dextrose	6,0	g
Chlorure de sodium	2,5	g
Thioglycolate de sodium	0,5	g
Gélose	1,6	g
L-Cystine	0,25	g
Sulfite de sodium	0,1	g
Amphotéricine B	2,0	mg
Céfalotine	15,0	mg
Triméthoprim	5,0	mg
Vancomycine	10,0	mg
Polymyxine B	2 500,0	unités

*Ajustée et/ou complétée 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.

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 »⁷⁻¹⁰ et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques. 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

Dès 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 être ensemencés jusqu'à la date de péremption indiquée et incubés pendant les durées recommandées.

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.^{11,12} Prélever les échantillons avant l'administration des agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

IX PROCEDURE

Matériaux fournis

Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics

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.

1. Prélèvement, stockage et repiquage de l'échantillon en boîte de Pétri.¹³

Introduire l'écouvillon rectal d'environ 1 cm à l'intérieur du milieu puis le faire pivoter. Retirer l'écouvillon ou l'enfoncer jusqu'en bas du tube puis briser la tige de manière régulière en s'aidant du bord du tube pour faciliter l'accès au corps de l'écouvillon.

Si les échantillons sont composés de selles solides, préparer une suspension saline, vortexer et introduire cinq gouttes dans le milieu à environ 1 cm sous la surface. Il est aussi possible de sonder toutes les parties de l'échantillon fécal avec un écouvillon et d'ensemencer le milieu de la même manière qu'avec un écouvillon rectal.

Si les échantillons sont composés de selles diarrhéiques, introduire cinq gouttes dans le milieu à environ 1 cm sous la surface.

Réfrigérer pendant une nuit le Campylobacter Thioglycollate Medium ensemencé puis, le jour suivant, repiquer dans des boîtes de Pétri de Campylobacter Agar with 5 Antimicrobics additionnée de 10 % de sang de mouton. Pour cela, insérer une pipette Pasteur environ 2 cm sous la surface du bouillon de manière à pouvoir prélever l'échantillon en continu, jusqu'à ce que l'embout de la pipette atteigne lentement la surface. Ne pas repiquer en milieux non sélectifs car il est possible que la flore normale soit encore viable.

2. Incubation des milieux en boîtes de Pétri.

Incuber les milieux en boîtes de Pétri à 42 °C, dans une atmosphère réduite en oxygène, et supplémentée en dioxyde de carbone. Une telle atmosphère peut être obtenue en utilisant une enveloppe génératrice de gaz jetable **BBL CampyPak** dans un récipient **GasPak** 100 ou trois enveloppes dans un récipient **GasPak** 150, ou encore les systèmes **BBL CampyPouch**, **Bio-Bag** Type Cfj ou **GasPak** EZ Campy. Cette atmosphère peut aussi être obtenue en vidant les récipients ventilés **GasPak** pour les remplir de gaz en bouteille,⁶ ou en appliquant le principe de Fortner.¹⁴

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.

X RESULTATS

Dans les boîtes de Pétri de gélose Campylobacter Agar with 5 Antimicrobics additionnée de 10 % de sang de mouton ensemencées à partir de Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics, rechercher la présence de colonies de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*. Sur ce type de gélose, ces colonies sont de taille réduite, ont un aspect muqueux et généralement grisâtre. Elles sont plates avec des bords irréguliers, et ne présentent aucun signe d'hémolyse au bout de 24 h et de 48 h.¹⁵

Il est possible que les colonies soient à peine visibles au bout de 18 à 24 h. Elles peuvent aussi présenter un aspect morphologique autre, apparemment en fonction du type de souche. Elles se présentent alors sous forme de colonies arrondies de 1 à 2 mm de diamètre, convexes, d'un seul bloc et luisantes.¹⁵ Un faible pourcentage des souches peut prendre une coloration marron ou légèrement rosée.¹³

Les colonies ont tendance à s'étendre ou à essaimer, en particulier si elles ont été isolées d'échantillons cliniques frais. Remarque : Si les boîtes de Pétri doivent être examinées après 24 h d'incubation, les traiter comme s'il s'agissait de cultures anaérobies : les examiner rapidement et les replacer immédiatement dans une atmosphère réduite en oxygène.

XI LIMITES DE LA PROCEDURE

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.^{11,12,16}

XII CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Le résultat obtenu grâce à l'utilisation combinée de la gélose au sang Campylobacter et de Campylobacter Thioglycollate Medium, les deux contenant cinq agents antimicrobiens, est de 33 % supérieur à celui obtenu par la seule utilisation d'un milieu en boîte de Pétri, et de 28 % supérieur à celui atteint lorsque seul un milieu de type bouillon est utilisé.⁴ Luechtefeld et al. ont indiqué que la conservation d'échantillons fécaux de dinde à 4 °C pendant toute une nuit

n'augmente pas de manière significative le nombre de réactions positives dans le Campylobacter Thioglycollate Medium.¹⁷

XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
221747	BD BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics , boîte de 10 tubes de taille K
221748	BD BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics , carton de 100 tubes de taille K

XIV REFERENCES

1. Dekeyser, P., M. Gossuin-Detrain, J.P. Butzler, and J. Sternon. 1972. Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures. *J. Infect. Dis.* 125:390-392.
2. Skirrow, M.B. 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br. Med. J.* 2:9-11.
3. Blaser, M., J. Cravens, B.W. Powers, and W.L. Wang. 1978. *Campylobacter* enteritis associated with canine infection. *Lancet* 2:979-980.
4. Blaser, M.J., V. Berkowitz, F.M. LaForce, J. Cravens, L.B. Reller, and W.L.L. Wang. 1979. *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiologic features. *Ann. Intern. Med.* 91:179-185.
5. Reller, L.B., W.L.L. Wang, and M.J. Blaser. 1979. *Campylobacter* enteritis: *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni*. ASCP Check Sample, Microbiology No. MB-99, Commission on Continuing Education, American Society of Clinical Pathologists, Chicago.
6. Nachamkin, I. 1999. *Campylobacter* and *Archobacter*, p. 716-726. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
8. 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.
9. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
10. 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.
11. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Tenover, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.). 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
13. Kaplan, R.L. 1980. *Campylobacter*, p. 235-241. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr., and J.P. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 3rd ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
14. Karmali, M.A., and P.C. Fleming. 1979. Application of the Fortner principle to isolation of *Campylobacter* from stools. *J. Clin. Microbiol.* 10:245-247.
15. Smibert, R.M. 1984. Genus *Campylobacter* Sebald and Veron 1963, 907, p. 111-118. In N.R. Krieg, and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
16. 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.
17. Luechtefeld, N.W., W.L.L. Wang, M.J. Blaser, and L.B. Reller. 1981. Evaluation of transport and storage techniques for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from turkey fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 13:438-443.

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