



PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE (Facultatif)

I INTRODUCTION

Le Fluid Thioglycollate Medium est un milieu polyvalent servant à la culture des anaérobies, des microaérophiles et des aérobies, et l'un des milieux recommandés pour les tests de stérilité des liquides organiques.

II MODE OPERATOIRE DU TEST

1. Ensemencer des échantillons représentatifs avec les cultures répertoriées ci-dessous.
 - a. Avant l'emploi, desserrer les bouchons et placer les tubes au bain-marie à ébullition* pendant environ 5 min jusqu'à réduction du milieu (incolore). Sortir les tubes du bain-marie et visser immédiatement les bouchons. Laisser refroidir le milieu jusqu'à la température ambiante.
***REMARQUE :** Il n'est pas recommandé d'utiliser un four à micro-ondes.
 - b. Préparer des dilutions à 100 UFC/mL au maximum de cultures en bouillon de soja **Trypticase** Soy Broth ou Enriched Thioglycollate Medium des souches *Bacteroides* et *Clostridium* âgées de 24 à 48 h.
 - c. A l'aide de pipettes stérile de 1,0 mL, ensemencer des tubes avec 0,75 mL des dilutions.
 - d. Incuber les tubes avec les bouchons desserrés à une température comprise entre 30 et 35 °C en atmosphère aérobie, à l'exception des souches CLSI (*Bacteroides fragilis* ATCC 25285 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) qui doivent être incubées avec les bouchons bien vissés.
2. Examiner les tubes contenant les souches de contrôle recommandées par la CLSI (bouchons bien vissés) après 18 à 24 h et 48 h pour déceler une éventuelle croissance. Examiner les tubes des autres souches de contrôle (recommandées par l'U.S.P.) jusqu'à 3 jours pour déceler une croissance éventuelle.
3. Résultats attendus

Souches de contrôle CLSI (souches ATCC)

**Bacteroides fragilis* Croissance
(25285)

**Staphylococcus aureus* Croissance
(25923)

Souches supplémentaires utilisées

(test de promotion de croissance USP) :

***Staphylococcus aureus* Croissance
ATCC 6538

***Pseudomonas aeruginosa* Croissance
ATCC 9027

***Clostridium sporogenes* Croissance
ATCC 11437

***Clostridium sporogenes* Croissance
ATCC 19404

***Bacillus subtilis* Croissance
ATCC 6633

***Kocuria rhizophila* Croissance
ATCC 9341

***Bacteroides vulgatus* Croissance
ATCC 8482

* Souche de microorganisme recommandée pour le contrôle de qualité par l'utilisateur.

** Vérification des propriétés de promotion de la croissance avant utilisation dans les tests de stérilité USP.

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. Mesurer le pH par potentiométrie à température ambiante et s'assurer qu'il est conforme à la spécification de $7,1 \pm 0,2$.

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

Le Fluid Thioglycollate Medium (milieu thioglycolate liquide) est conforme aux spécifications de la pharmacopée américaine (*USP*).

Le Fluid Thioglycollate Medium (FTM) s'utilise pour les tests de stérilité des liquides organiques et la culture des anaérobies, des aérobies et des microaérophiles.

V RESUME ET EXPLICATION

Le Fluid Thioglycollate Medium a été mis au point par Brewer pour cultiver rapidement des anaérobies ainsi que des aérobies.¹ Il a été d'abord produit sous forme déshydratée par le *Baltimore Biological Laboratory* (BBL) en 1940. L'incorporation de peptone de caséine a été introduite par Vera en 1944.²

Ce milieu permet de cultiver un grand nombre de microorganismes exigeants appartenant à des espèces pathogènes et non pathogènes. L'une des caractéristiques du thioglycolate de sodium, outre son pouvoir de réduction du potentiel d'oxydoréduction, est sa capacité à neutraliser l'activité antibactérienne des composés du mercure. Par ces caractéristiques, le FTM est particulièrement utile pour établir la présence d'une contamination dans les échantillons biologiques et autres. La formule **BBL** satisfait aux exigences des tests de promotion de croissance *USP*.³

Une fois préparé, le Fluid Thioglycollate Medium peut être utilisé jusqu'à un niveau d'oxydation de 30 %, comme l'indique la couleur rose de la résazurine à sa surface. En cas d'oxydation plus avancée, le bouillon peut être réutilisé une fois après traitement thermique à la vapeur ou au bain-marie à ébullition, puis refroidissement.

VI PRINCIPES DE LA METHODE

Le dextrose, la peptone, la L-cystine et l'extrait de levure apportent les facteurs de croissance nécessaires à la réplication bactérienne. Le chlorure de sodium apporte les électrolytes essentiels. Le thioglycolate de sodium est un agent réducteur qui empêche l'accumulation de peroxydes délétères pour certains microorganismes. Le L-cystine est également un agent réducteur dont les groupes sulfhydryles inactivent les métaux lourds et maintiennent un faible potentiel redox, favorable à l'anaérobiose. La résazurine est un indicateur d'oxydoréduction, incolore à l'état réduit et rose à l'état oxydé. Une petite quantité de gélose contribue à entretenir un faible potentiel redox en réduisant les courants de convection dans le milieu, ce qui préserve l'anaérobiose en profondeur dans le milieu.⁴ La formulation *USP*³ du Fluid Thioglycollate Medium contient 5,5 g/L de dextrose. La formule **BBL** contient 5,0 g/L de la forme anhydre du dextrose.

VII REACTIFS

Fluid Thioglycollate Medium

Formule approximative* par litre d'eau purifiée

Digestion pancréatique de caséine.....	15,0	g
L-cystine	0,5	g
Dextrose (anhydre)	5,0	g
Extrait de levure	5,0	g
Chlorure de sodium	2,5	g
Thioglycolate de sodium	0,5	g
Résazurine.....	0,001	g
Gélose.....	0,75	g

*Ajustée et/ou complémentée 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 micro-organismes 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 »⁵⁻⁸ 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

Dès réception, conserver les tubes dans l'obscurité conformément aux instructions de la notice. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Ne pas les ouvrir prématurément. Les maintenir à l'abri de la lumière. Conservés comme indiqué sur l'étiquette, les milieux en tube peuvent être ensemencés jusqu'à la date de péremption et incubés pendant les durées d'incubation 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 culture peuvent être préparés selon différentes techniques. Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.^{9,10} Prélever les échantillons avant l'administration d'agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

IX METHODE

Matériaux fournis

Fluid Thioglycollate Medium

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.

Avant l'emploi, desserrer les bouchons et placer les tubes au bain-marie à ébullition* pendant environ 5 min jusqu'à réduction du milieu (incolore). Sortir les tubes du bain-marie et visser immédiatement les bouchons. Laisser refroidir le milieu jusqu'à la température ambiante.

Pour une utilisation courante, ensemencer directement le milieu avec les échantillons et incuber les tubes jusqu'à 7 jours à 35 ± 2 °C.

Suivre les recommandations de l'USP³ et des différents organismes de réglementation pour réaliser les tests de stérilité.¹¹ Ces réglementations spécifient le ratio milieu/produit à utiliser dans les tests de stérilité et détaillent la méthode de prélèvement et d'interprétation des résultats du test. Pour un test de stérilité, il est important de réduire suffisamment le milieu contenu dans les récipients de test pour permettre la réplique des anaérobies obligatoires et des microorganismes microaérophiles. Si la turbidité due à l'échantillon rend difficile l'identification de la croissance microbienne dans le milieu, effectuer des transferts dans du milieu frais.

***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 ».

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.

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

A l'issue de l'incubation, la croissance est révélée par l'apparition d'une turbidité comparative au milieu de contrôle non ensemencé. Les aérobies stricts ont tendance à croître dans une mince couche en surface du bouillon; les anaérobies obligatoires ne se développent que dans la partie du bouillon située sous la couche oxydée (rose) supérieure. En

prélevant avec précaution du liquide à différents niveaux, il est possible de mieux séparer différentes espèces en culture mixte.

XI LIMITES DE LA PROCEDURE

Les anaérobies peuvent être supplantés par des microorganismes anaérobies facultatifs à croissance plus rapide. Réaliser une coloration de Gram sur le bouillon en l'absence de croissance sur le milieu d'étalement. Ne jamais s'en remettre uniquement à des cultures en bouillon pour isoler des anaérobies. Certains anaérobies peuvent être inhibés par des métabolites ou des acides produits par des anaérobies facultatifs à croissance plus rapide.¹²

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.

Pour procéder à l'identification, les microorganismes doivent se trouver en culture pure. L'identification définitive nécessite des tests morphologiques, biochimiques et/ou sérologiques. Consulter les publications citées en référence pour plus d'informations sur les méthodes recommandées.^{9,10,13}

XII CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Tous les lots de Fluid Thioglycollate Medium sont testés en usine afin de vérifier la conformité des performances avec les spécifications. Avant ensemencement, des échantillons représentatifs du lot sont réduits au bain-marie à ébullition pendant environ 5 min. Après refroidissement, les tubes sont ensemencés avec 0,75 mL de cultures de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *B. vulgatus* (ATCC 8482), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437 et ATCC 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 et ATCC 25923). Les inoculums de *B. subtilis*, *B. fragilis*, *C. sporogenes*, *K. rhizophila*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* sont dilués à 100 unités formant colonies (UFC) par mL au maximum. L'inoculum de *B. vulgatus* est préparé à partir de colonies prélevées sur des boîtes de gélose anaérobie du CDC complète de 5 % de sang de mouton et ajustés en Thioglycollate Medium without Dextrose and Indicator à une concentration de 10 à 100 UFC/mL. Les bouchons des tubes ensemencés avec *B. fragilis* et *S. aureus* sont vissés immédiatement ; les autres tubes sont incubés avec les bouchons desserrés. Les tubes sont incubés à 35 ± 2 °C. Les cultures de *B. fragilis* et *S. aureus* (ATCC 25923) présentent une croissance très faible à importante dans les 48 h d'incubation. Les autres cultures présentent une croissance modérée à importante dans les 3 jours d'incubation.

XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
221195	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, coffret de 10 tubes de taille K
221196	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, carton de 100 tubes de taille K
299802	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, carton de 100 tubes de taille K (étiquette jet d'encre)
220888	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, coffret de 10 tubes de taille A
220889	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, carton de 100 tubes de taille A
299803	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, carton de 100 tubes de taille A (étiquette jet d'encre)

XIV REFERENCES

1. Brewer, J.H. 1940. Clear liquid medium for the "aerobic" cultivation of anaerobes. J. Am. Med. Assoc. 115:598-600.
2. Vera, H.D. 1944. A comparative study of materials suitable for the cultivation of clostridia. J. Bacteriol. 47:59-70.
3. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. 2009. The U.S. pharmacopeia 32/The national formulary 27. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md.
4. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.

6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
11. Horwitz, W. (ed.). 2000. *Official methods of analysis of AOAC International*, 17th ed, vol.1. AOAC International, Gaithersburg, Md.
12. Reischelderfer and Mangels. 1992. In Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. 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