



**BBL Thioglycollate Medium,
Enriched with Vitamin K₁ and Hemin
L007509 • Rev. 14 • Octobre 2015**



PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE (Facultatif)

I INTRODUCTION

Le Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin est un milieu polyvalent servant à la culture des microorganismes exigeants et non exigeants.

II MODE OPERATOIRE DU TEST

1. Réduire les tubes de milieu avec les bouchons desserrés au bain-marie à ébullition*. Après ébullition, visser immédiatement les bouchons et laisser refroidir les tubes jusqu'à la 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 en Enriched Thioglycollate Medium ou en milieu à la viande hachée, ou des colonies prélevées sur une gélose anaérobie du CDC complétée de 5 % de sang de mouton et transférées dans un tube d'Enriched Thioglycollate Medium réduit au préalable, et ajuster la densité de l'inoculum à une turbidité équivalente à celle d'un standard McFarland 0,5.
3. A l'aide d'un ensemencur à anse calibrée de 0,01 mL stérile, ensemencer les tubes avec l'inoculum standardisé de chaque microorganisme.
4. Incuber les tubes avec les bouchons vissés à 35 ± 2 °C en atmosphère aérobie.
5. Examiner les tubes après 18 à 24 h et 42 à 48 h pour déceler une éventuelle croissance.
6. Résultats attendus

Souches de contrôle CLSI (souches ATCC)

**Peptostreptococcus anaerobius*.....Croissance
(27337)

**Bacteroides vulgatus*Croissance
(8482)

**Clostridium perfringens*.....Croissance
(13124)

Souches supplémentaires utilisées

Porphyromonas leviiCroissance
(29147)

Clostridium novyi ACroissance
ATCC 7659

*Souche de microorganisme recommandée pour le contrôle de qualité 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. S'assurer que le pH mesuré par potentiométrie à température ambiante est conforme à la spécification (7,0 ± 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 Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin (milieu au thioglycolate enrichi de vitamine K₁ et d'hémine) est un milieu polyvalent utilisé dans le cadre de procédures qualitatives pour cultiver des microorganismes exigeants et non exigeants, y compris des bactéries anaérobies ou aérobies, à partir de différents échantillons cliniques et non cliniques.

V RESUME ET EXPLICATION

L'Enriched Thioglycollate Medium est le milieu au thioglycolate **BBL Thioglycollate Medium** dépourvu d'indicateur -135C, mais complété de vitamine K₁ et d'hémine.¹⁻³ Le milieu à base de bouillon enrichi est recommandé pour l'isolement et la culture des microorganismes anaérobies obligatoires exigeants ou à croissance lente présents dans des échantillons cliniques.^{4,5} Il est également recommandé pour l'isolement et la culture d'un grand nombre de microorganismes aérobies et anaérobies facultatifs. Le milieu est préparé sous atmosphère anaérobie et fourni en tubes à bouchon à vis, conformément aux recommandations du CDC.⁴ Des auteurs ont montré que la vitamine K₁ et l'hémine sont indispensables à la croissance de certains anaérobies.^{6,7}

L'isolement de microorganismes à partir d'échantillons cliniques nécessite souvent l'utilisation de milieux à base de bouillon enrichi en plus des milieux sélectifs, différentiels et non sélectifs en boîtes de Pétri habituellement utilisés pour l'isolement primaire. L'utilisation de milieux « redondants » liquides réduit l'éventualité d'ignorer totalement un agent étiologique présent en

faible quantité, à croissance lente en milieu d'étalement, sensible aux agents sélectifs ou sensible à des conditions d'incubation défavorables, p. ex., anaérobiose insuffisante pour une croissance optimale des anaérobies obligatoires.

VI PRINCIPES DE LA METHODE

Le thioglycolate de sodium est un agent réducteur qui maintient une faible tension d'oxygène dans le milieu. La vitamine K₁ est indispensable à la croissance de *Prevotella melaninogenica*⁶ et connue pour favoriser la croissance de certaines souches d'espèces de *Bacteroides* et de bactéries à Gram positif non sporulées.⁶ L'hémine est la source de facteur X qui stimule la croissance de nombreux microorganismes.

VII REACTIFS

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin

Formule approximative* par litre d'eau purifiée

Digestion pancréatique de caséine	17,0	g
Digestion papaïque de semoule de soja	3,0	g
Dextrose	6,0	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

*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 »⁹⁻¹² 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, 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 tubes de milieu conservés comme indiqué sur l'étiquette 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 manipulés selon différentes techniques. Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.^{13,14} Prélever les échantillons avant l'administration d'agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

IX METHODE

Matériaux fournis

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin

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.

Réduire avant ensemencement les milieux liquides destinés à une incubation anaérobie en plaçant les tubes, avec les bouchons desserrés, en condition anaérobie pendant 18 à 24 h avant l'emploi. Le système anaérobie **BBL GasPak EZ** permet d'obtenir facilement et efficacement des conditions anaérobies adéquates. Immédiatement avant l'emploi, les milieux liquides peuvent aussi être réduits par ébullition*, avec les bouchons desserrés, puis refroidissement, avec les bouchons bien vissés, jusqu'à température ambiante avant de les ensemencer.

Ensemencer les milieux préconisés avec l'échantillon dès réception au laboratoire. Dans le cas d'un échantillon liquide, ensemencer le milieu en tube avec une ou deux gouttes d'échantillon. Les biopsies servant à la culture des microorganismes doivent être hachées et dilacérées dans du bouillon réduit stérile comme l'Enriched Thioglycollate Medium. Procéder ensuite comme pour un échantillon liquide pour ensemencer le milieu. Les écouvillonnages peuvent être introduits dans le bouillon après ensemencement des milieux en boîte de Pétri. L'écouvillon peut également être « frotté » dans un petit volume de

bouillon réduit stérile comme l'Enriched Thioglycollate Medium. Procéder ensuite comme pour un échantillon liquide pour ensementer les milieux avec ce bouillon.

Les échantillons suspectés de contenir ou contenant des anaérobies obligatoires doivent être ensementés à proximité du fond du tube. Incuber les tubes en conditions aérobies, avec les bouchons bien vissés, à 35 ± 2 °C ou toute autre température appropriée.

Les cultures en bouillon doivent être maintenues pendant au moins une semaine avant de conclure à un test négatif.¹⁵

***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

Une croissance bactérienne dans un milieu à base de bouillon, comme l'Enriched Thioglycollate Medium, est mise en évidence par l'apparition d'une turbidité dans le tube comparativement au contrôle non ensementé.

Si une croissance est manifeste, réaliser une coloration de Gram sur la culture et la repiquer sur des milieux sélectifs et non sélectifs d'étalement. Si l'on soupçonne la présence d'anaérobies, repiquer la culture sur des milieux d'étalement anaérobies adéquats.

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.¹⁵

Pour procéder à l'identification, les microorganismes doivent se trouver en culture pure. Des tests morphologiques, biochimiques et/ou sérologiques doivent être effectués pour l'identification finale. Consulter les publications citées en référence pour plus d'informations sur les méthodes recommandées.^{13,14,16}

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 de Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin sont testés en usine fin d'établir leurs caractéristiques de performances. Avant ensementement, des échantillons représentatifs du lot sont réduits au bain-marie à ébullition pendant au moins 10 minutes, puis refroidis. A l'aide d'un ensementeur à anse calibrée de 0,01 mL, ensementer les tubes avec des cultures de turbidité équivalente à celle d'un standard McFarland 0,5. Les inoculums de *Porphyromonas levii* (ATCC 29147), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) et *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) sont préparés à partir de colonies prélevées sur une gélose anaérobie du CDC complétée de 5 % de sang de mouton. Leur densité est ajustée par ajout d'Enriched Thioglycollate Medium préalablement réduit. L'inoculum de *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) est prélevé sur du Enriched Thioglycollate Medium et l'inoculum de *C. novyi* A (ATCC 7659) est prélevé sur du bouillon Chopped Meat Glucose Broth, PR II. Les tubes sont ensementés sous la surface des bouillons, aussi profondément que possible dans le milieu. Les bouchons sont vissés immédiatement après ensementement et les tubes sont incubés à 35 ± 2 °C en conditions aérobies. Les tubes sont examinés après 18 à 24 h et 42 à 48 h pour évaluer la croissance bactérienne. Toutes les cultures présentent une croissance très faible à importante après 48 h.

XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
221742	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 5 mL
221787	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 8 mL
221788	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 8 mL
297292	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 10 mL

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. Finegold, S.M., V.L. Sutter, H.R. Attebery, 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.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Tenover, M.L. Landry and M.A. Pfaller (ed.). 2007. *Manual of clinical microbiology*, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
15. Reischelderfer, C., and J.I. Mangel. 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.
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.

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