



BBL Thioglycollate Medium without Indicator-135C



L007512 • Rév. 14 • Avril 2015

PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE

I INTRODUCTION

Le Thioglycollate Medium without Indicator-135C est un milieu polyvalent servant à la culture des microorganismes, en particulier des anaérobies obligatoires.

II MODE OPERATOIRE DU TEST

- Ensemencer des échantillons représentatifs avec les cultures répertoriées ci-dessous.
 - Desserrer les bouchons et placer les tubes au bain-marie à ébullition* pendant 2 à 5 min. Sortir les tubes et visser immédiatement les bouchons, puis laisser refroidir le milieu jusqu'à la température ambiante avant l'emploi.
***REMARQUE :** Il n'est pas recommandé d'utiliser un four à micro-ondes.
 - A l'aide de pipettes stérile de 1,0 mL, ensemer des tubes de Thioglycollate Medium avec 1,0 mL de dilutions de cultures en bouillon âgées de 18 à 24 h. Utiliser du bouillon Chopped Meat Carbohydrate Broth pour *Bacteroides fragilis* et du bouillon **Trypticase** Soy Broth pour *Staphylococcus aureus*. La dilution utilisée doit contenir au maximum 1000 UFC/mL pour *S. aureus* et 10^5 à 10^6 UFC/mL pour *B. fragilis*.
 - Incuber les tubes, avec les bouchons bien vissés, à 35 ± 2 °C en atmosphère aérobie.
- Examiner les tubes après 18 à 24 h et 48 h pour déceler une éventuelle croissance.
- Résultats attendus

Microorganismes	ATCC	Isolement
* <i>Bacteroides fragilis</i>	25285	Croissance
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Croissance

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

III CONTROLE DE QUALITE SUPPLEMENTAIRE

- Examiner les tubes comme décrit à la rubrique « Détérioration du produit ».
- Inspecter visuellement des tubes représentatifs pour s'assurer qu'aucun défaut physique ne peut interférer avec leur utilisation.
- Mesurer le pH par potentiométrie à température ambiante et s'assurer qu'il est conforme à la spécification de $7,0 \pm 0,2$.
- 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 without Indicator-135C (milieu thioglycollate sans indicateur-135C) est un milieu polyvalent servant à la culture d'un grand nombre de microorganismes, en particulier des anaérobies obligatoires, à partir d'échantillons cliniques et non cliniques.

V RESUME ET EXPLICATION

Le milieu thioglycollate a été décrit à l'origine par Brewer¹ comme un milieu favorisant la croissance des anaérobies obligatoires comme des aérobies. Le milieu thioglycollate d'origine a été modifié pour lui conférer les qualités nutritionnelles du **Trypticase** Soy Broth. Par conséquent, la formule améliorée, nommée 135C, permet de cultiver un grand nombre de microorganismes exigeants, pathogènes ou non pathogènes.² La formule d'origine contenait également du bleu de méthylène, contrairement à la formule actuelle qui ne contient plus d'indicateur de potentiel redox. Ceci évite les problèmes liés à la toxicité potentielle de l'indicateur et facilite également la détection précoce de la croissance bactérienne.

Le Thioglycollate Medium-135C se caractérise par sa remarquable aptitude à favoriser la croissance d'un grand nombre de microorganismes aérobies et anaérobies à partir d'un très faible inoculum. Les espèces les plus strictement aérobies se développent en surface, alors que les anaérobies se développent plus en profondeur dans le milieu.

Le Thioglycollate Medium-135C est par conséquent recommandé comme milieu polyvalent, milieu d'hémoculture et milieu de culture de tout échantillon susceptible de comprendre une grande variété d'aérobies, d'anaérobies facultatifs ou d'anaérobies.

L'incorporation de la caséine et des peptones de soja rend possible la culture de certains aérobies, comme les microorganismes du genre *Brucella*, qui ne se développent pas facilement en Fluid Thioglycollate Medium. Les deux milieux permettent de cultiver des anaérobies strictes, comme *Clostridium novyi*, *C. acetobutylicum*, *Actinomyces bovis* et *Bacteroides*, de même que les pneumocoques, les streptocoques, les lactobacilles et d'autres bactéries anaérobies facultatives.

Le bouillon peut être complété de 10 % de sérum pour cultiver *Trichomonas vaginalis*, le spirochète de Reiter et d'autres microorganismes.

Pour cette raison, ce milieu donne satisfaction comme milieu de culture enrichi adapté à différents types d'échantillons ou comme milieu de transport. Dans ce cas, il est recommandé de lui adjoindre du CaCO_3 pour neutraliser l'acidité produite lors de la croissance et éviter ainsi une extinction rapide de la croissance des microorganismes exigeants. Un développement rapide suivi d'une extinction de la culture en l'absence de CaCO_3 peut être observé, par exemple, avec des cultures de pneumocoques, de cocci à Gram négatif, de *C. perfringens* et d'autres bactéries sensibles à l'acidité du milieu.

VI PRINCIPES DE LA METHODE

La caséine et les peptones de semoule de soja, le dextrose et la cystine apportent des composés azotés et carbonés, des hydrates de carbone fermentescibles et des oligo-éléments. Le chlorure de sodium apporte les électrolytes essentiels. Le soufre est apporté par le sulfite de sodium. Le thioglycolate de sodium est un agent réducteur qui abaisse le potentiel redox du milieu, permettant ainsi aux anaérobies de se développer en profondeur dans le milieu. Une petite quantité de gélose facilite la prévention des courants de convection dans le milieu et contribue ainsi à entretenir l'anaérobiose.³

VII REACTIFS

Thioglycollate Medium without Indicator-135C

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

*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 »⁴⁻⁷ 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 de 2 à 8 °C. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Ne pas ouvrir prématurément. 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.^{3,8} Prélever les échantillons avant l'administration d'agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

IX METHODE

Matériaux fournis : Thioglycollate Medium without Indicator-135C

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 de les ensemencer, réduire les milieux liquides destinés à une incubation anaérobie en plaçant les tubes, avec les bouchons desserrés, en conditions anaérobies 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 jusqu'à température ambiante, avec les bouchons bien vissés, avant d'être ensemencés.

Ensemencer le milieu avec l'échantillon dès que possible après réception au laboratoire. Dans le cas d'un échantillon liquide, ensemencer les milieux 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. 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, en procédant ensuite comme pour un échantillon liquide pour ensemencer les milieux avec ce bouillon.

Les échantillons suspectés de contenir ou contenant des anaérobies obligatoires doivent être ensemencés à proximité du fond du tube.

Incuber les tubes avec les bouchons bien vissés en conditions aérobies à 35 ± 2 °C, ou à autre température appropriée suivant le type de microorganisme cultivé, et les examiner quotidiennement jusqu'à 7 jours avant de conclure à un test négatif, sauf si des circonstances particulières imposent une incubation prolongée.^{3,9}

***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 aux réglementations nationales et/ou internationales, 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 croissance en tubes de bouillon est mise en évidence par l'apparition d'une turbidité comparativement au milieu de contrôle non ensemencé. Effectuer des repiquages sur des milieux solides appropriés pour obtenir des cultures pures des isolats, puis réaliser les analyses et les tests d'identification complémentaires.

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.⁹

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.^{3,8,9}

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

Les caractéristiques de performances de tous les lots de Thioglycollate Medium without Indicator-135C sont testées en usine. Avant ensemencement, des échantillons représentatifs du lot sont réduits au bain-marie à ébullition pendant 2 à 5 min. Après refroidissement, les tubes sont ensemencés avec des cultures de *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Clostridium novyi* (ATCC 7659) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). L'inoculum (1 mL) de *S. aureus* est une dilution à 1000 unités formant colonies (UFC) par mL au maximum d'une culture en bouillon. L'inoculum (1 mL) de *B. fragilis* est une dilution à 10^5 à 10^6 UFC par mL d'une culture en bouillon. L'inoculum (anse de 0,01 mL) de *C. novyi* est prélevé dans une culture en bouillon non diluée ; l'inoculum est introduit au fond du tube. Les bouchons sont vissés immédiatement après ensemencement et les tubes sont incubés à 35 ± 2 °C. 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
221199	BD BBL Thioglycollate Medium without Indicator-135C, 8 mL, coffret de 10 tubes de taille K
221200	BD BBL Thioglycollate Medium without Indicator-135C, 8 mL, carton de 100 tubes de taille K CE
221047	BD BBL Thioglycollate Medium without Indicator-135C, 20 mL, carton de 100 tubes de taille A

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. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.

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