

Egalement nommé

Gélose chocolat enrichie

Principe

Base de milieu solide particulièrement recommandée pour l'isolement et la culture de micro-organismes exigeants.

Formule * en g/L

Peptone spécial.....	15.00
Amidon.....	1.00
Chlorure de sodium.....	5.00
Dipotassium phosphate.....	4.00
Potassium phosphate.....	1.00
Dextrose.....	1.50
Sodium bicarbonate.....	0.15
Extrait de levure.....	10.00
Agar.....	12.00

pH final 7,2 ±0,2 à 25 °C

*Ajuster et/ou compléter au besoin pour répondre aux critères de performance

Préparation

Mettre en suspension 24,8 g de poudre dans 250 mL d'eau distillée et porter à ébullition. Répartir dans un flacon de 1 L et stériliser à l'autoclave à 121 ° C pendant 15 minutes. Diluer 5 g de poudre d'hémoglobine dans 250 ml d'eau distillée chaude, en remuant constamment, pour obtenir une solution homogène. Stérilisez à l'autoclave à 121 ° C pendant 15 minutes.

Refroidir les deux flacons à 50 ° C et ajouter de manière aseptique la solution d'hémoglobine stérile à la base moyenne. Pour faciliter la détection de *Neisseria*, il est recommandé d'ajouter un flacon de supplément sélectif VCAT (Art. No. 928220NL1). Homogénéiser par rotation pour éviter les bulles et verser dans des assiettes.

Description

La base peut être utilisée dans les applications suivantes:

Gélose au chocolat

Il est préparé avec la base d'agar et l'hémoglobine, sans aucun inhibiteur. Le sang défibriné peut être utilisé dans un rapport de 1:10 si nécessaire, c'est-à-dire 10 ml de sang pour 100 ml de base préparée, refroidi à 45 ° C. Placer le milieu complet dans un bain bouillant pendant quelques secondes, trois fois consécutives; le médium deviendra de couleur brun chocolat noir. Ce milieu permet la croissance de micro-organismes très exigeants, comme *Haemophilus influenzae*.

Gélose Thayer-Martin

En 1966, Thayer et Martin ont décrit un milieu qui s'est avéré très efficace pour isoler des agents pathogènes tels que *Neisseria*. Le milieu est préparé avec une base GC Agar, de l'hémoglobine et un flacon d'inhibiteur de VCNT Selective Supplement (Art. N ° DSHB3160) qui contient les antibiotiques: vancomycine et colistine pour inhiber les contaminants oxydase-positifs; la nystatine pour empêcher la croissance des champignons saprophytes et le triméthoprime pour empêcher la prolifération de *Proteus* comme démontré par Odegaard et Phillips en 1970. La récupération des cellules stressées est améliorée lorsqu'un flacon de GPS - Growth Promotion Supplement (Art. No. DSHB3076) est ajouté.

Gélose Transgrow

Ce milieu s'est avéré très efficace pour le stockage, le transport et la culture de *Neisseria*.

La préparation de ce milieu est la même que celle de la Thayer-Martin Agar mais elle est répartie dans des tubes hermétiques à bouchon à vis solidifiés en position horizontale.

Utilisation

Lorsque le prélèvement est effectué à proximité du laboratoire, les plaques Thayer-Martin peuvent être directement inoculées. Si l'échantillon doit être transporté au laboratoire, le milieu Transgrow est préféré.

Test gonococcique:

Chez les femmes, il est recommandé de prélever des échantillons dans l'un des éléments suivants:

Lorsque cela est possible, du col de l'utérus, après avoir retiré la muqueuse cervicale.

Si la culture cervicale est négative, des cultures rectales peuvent être effectuées à partir d'échantillons prélevés dans le rectum.

Si un échantillon cervical ne convient pas, par exemple chez les filles ou après une hystérectomie, des cultures vaginales ou urétrales peuvent être réalisées avec les échantillons correspondants.

Chez les hommes, une culture urétrale à partir d'échantillons de muqueuses est recommandée. Les cultures anale et pharynx peuvent également être appropriées.

Pour le diagnostic de la gonorrhée chez la femme, une croissance de cocci Gram négatif avec une morphologie spécifique est nécessaire, associée à une réaction d'oxydase positive. Cependant, lors du diagnostic des hommes, la mise en évidence de gonocoques intracellulaires dans les exsudations urétrales est suffisante. La culture pour l'identification biochimique ne doit être effectuée que lorsque le premier test n'est pas possible. Dans des cas particuliers, des fermentations ou des réactions avec des anticorps fluorescents peuvent être utilisées pour mettre en évidence la présence de *Neisseria gonorrhoeae*. La préparation microscopique à partir des exsudats urétraux doit être effectuée très soigneusement afin de conserver la morphologie cellulaire.

L'inoculation de la plaque est effectuée en dessinant un Z sur la surface avec l'écouvillon; est un mouvement de roulement. Après cela, l'échantillon est dispersé avec une boucle. Incuber à $37^{\circ}\text{C} \pm 1$, dans une atmosphère très humide enrichie à 10% de CO₂.

N. gonorrhoeae et *N. meningitidis* produisent des colonies incolores et translucides.

L'antibiotique incorporé dans le milieu avec supplément inhibiteur évite la croissance de presque tous les micro-organismes non pathogènes de l'échantillon, y compris les espèces saprophytes de *Neisseria*. Thayer-Martin Medium inhibe également *Mima polymorpha* var *oxydans*, un micro-organisme qui peut parfois être confondu avec *Neisseria gonorrhoeae*.

Les tubes Transgrow sont inoculés en introduisant l'écouvillon très soigneusement, en le pressant contre les parois et en atteignant le fond du tube. Extraire soigneusement l'écouvillon pour réduire la perte de CO₂.

Transport:

Si possible, l'échantillon doit être incubé à $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ pendant 12 à 16 heures avant d'être transporté au laboratoire. Transgrow Medium maintient la *neisseria* en vie jusqu'à 48 heures, même à température ambiante. Au laboratoire, incuber les tubes ou, s'ils ont déjà été incubés, examiner la croissance.

Le milieu Transgrow, avec 10% de CO₂, permet la croissance des *neisseria* pathogènes et inhibe tous les autres micro-organismes contaminants de la même manière que le milieu Thayer-Martin.

Les tubes Transgrow Medium, s'ils sont bien fermés, avec une atmosphère de CO₂ et réfrigérés, sont utilisables pendant au moins 3 mois après la préparation.

Suppléments nécessaires

Supplément sélectif VCAT (Art. N ° 928220NL)

Contenu du flacon:

Quantité nécessaire pour 500 ml de milieu complet.

Vancomycine 1,00 mg

Sulfate de colistine 3,75 mg

Amphotéricine B 0,50 mg

Triméthoprime 1,50 mg

Eau distillée (solvant)

Contrôle qualité

Température d'incubation: $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0$

Temps d'incubation: $48 \pm 2\text{h}$

Inoculum: Gamme d'utilisation 100 ± 20 UFC. Min. 50 UFC (Productivité) / 10^4 - 10^6 UFC (sélectivité) selon ISO 11133: 2014 / Amd 1: 2018.

Micro-organismes

Neisseria gonorrhoeae ATCC® 19424

Neisseria meningitidis ATCC® 13090

Croissance

Bonne

Bonne

Remarques

-

-

Références

- ATLAS, R.M. & L.C. PARKS (1997) Handbook of microbiological media. CRC Press. BocaRaton .Fla. USA.
- ISO/TS 11133-1: 2009 Microbiology of food and animal feeding stuffs.- Guidelines on preparation and production of culture media. Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.
- ISO/TS 11133-2: 2003 Corr. 2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs.- Guidelines on preparation and production of culture media. Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.
- MacFADDIN, J. (1985) Media for isolation-cultivation-Identification-maintenance of medical bacteria. Vol. I. William & Wilkins. Baltimore.
- ODEGAARD, K. (1971) Trimethoprim for the prevention of overgrowth by swarming Proteus in the cultivation of gonococci. Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect. (B) 79:545-548.
- THAYER, J. D. & J. E. MARTIN (1966). Improved medium selective for cultivation of Neisseria gonorrhoeae and N. meningitidis Pub. Health Rep. 81:559-562.

Conservation

Pour usage professionnel uniquement. À conserver fermé, loin de la lumière, dans un endroit frais et sec (+4°C à 30°C).