



## BD Sabouraud Glucose Agar

### APPLICATION

La **BD Sabouraud Glucose Agar** (gélose au glucose Sabouraud), fournie en flacons, est un milieu partiellement complété, utilisé pour l'isolement et la culture des champignons (levures, moisissures et dermatophytes) à partir de matières cliniques et non cliniques.

### PRINCIPES ET EXPLICATION DE LA METHODE

Méthode microbiologique.

La Sabouraud Glucose Agar a été conçue par Sabouraud pour la culture de dermatophytes.<sup>1,2</sup> Aujourd'hui, cette gélose est utilisée pour l'isolement et la culture de tous les champignons, notamment ceux provenant d'échantillons cliniques.<sup>3,4</sup> Le milieu inhibe légèrement les bactéries contaminantes, en raison de son faible pH et de sa forte concentration en glucose. Ce milieu est cité dans la pharmacopée américaine au chapitre des tests de dénombrement des microorganismes.<sup>5</sup> Lorsqu'il est complété avec 100 mg de tétracycline ou 100 mg de sodium de benzylpénicilline par litre, ce milieu est conforme à la spécification de la pharmacopée européenne.<sup>6</sup>

Dans la **BD Sabouraud Glucose Agar**, la néopeptone constitue une source de facteurs de croissance azotés. Le glucose (dextrose) fournit une source de carbone et d'énergie pour la croissance des microorganismes. La forte concentration en glucose et le pH relativement faible favorisent la croissance des champignons, mais de nombreuses bactéries ne tolèrent pas la forte concentration de sucre et sont partiellement inhibées par le faible pH. Cependant, sans enrichissement en antimicrobiens antibactériens, le milieu se caractérise par une faible sélectivité.

Les **BD Sabouraud Glucose Agar** sont des milieux partiellement complétés (semi-finis) et fournis en flacons, à partir desquels l'utilisateur peut préparer des milieux en boîtes de Pétri ou en tubes. Des agents antimicrobiens, tels que la gentamicine (0,04 g/L), le chloramphénicol (0,4 g/L), la tétracycline (0,1 g/L) ou la benzylpénicilline (0,1 g/L), peuvent être ajoutés avant de terminer la préparation, afin de renforcer la sélectivité.

### REACTIFS

#### BD Sabouraud Glucose Agar

Formule\* par litre d'eau purifiée

Bacto néopeptone	5,0 g
Glucose (dextrose)	40,0
Gélose	19,0

pH 5,6 ± 0,2

\*Ajustée et/ou complétée en fonction des critères de performances imposés.

### PRECAUTIONS

**IVD** . A usage professionnel uniquement.

Ne pas utiliser de flacons présentant des signes de contamination microbienne, décoloration, dessiccation ou fissure, ou d'autres signes de détérioration. Pour la finalisation de ce milieu partiellement complété fourni en flacons, se conformer aux méthodes et respecter les avertissements décrits sous **METHODE – Préparation des réactifs**. Consulter le document **MODE D'EMPLOI GENERAL** pour plus d'informations sur les procédures de manipulation aseptique, les risques biologiques et l'élimination des produits usagés.

## STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Dès réception, conserver les flacons dans l'obscurité entre 5 et 25 °C. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Les milieux peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée et incubés pendant les durées recommandées. Les flacons provenant de boîtes déjà entamées peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée. Les flacons ouverts doivent être utilisés immédiatement. Pour préparer des boîtes de Pétri ou des tubes à partir du milieu conditionné en flacons, il faut d'abord le liquéfier. Ne pas liquéfier plus d'une fois le milieu après sa solidification.

## CONTROLE DE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

Les boîtes préparées à partir du milieu semi-fini doivent êtreensemencées avec 10 à 100 UFC par boîte avec des souches de *C. albicans* et *A. niger*. Pour *S. cerevisiae* et *T. mentagrophytes*, utiliser une dilution au 1/10 d'une suspension dont la turbidité a été ajustée à une valeur équivalente au standard MacFarland 0,5 et ensemencer avec 10 µL (approximativement 10<sup>3</sup> UFC) par boîte. Pour plus d'informations, voir le document **MODE D'EMPLOI GENERAL**. Incuber les boîtes comme indiqué dans la note figurant au bas du tableau.

* <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Croissance bonne à importante
* <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCPF 1211 ou DSM 1333	Croissance bonne à importante
** <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Croissance bonne à importante
*** <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	Croissance bonne à importante
Sans ensemencement	Ambre ; le milieu en flacons peut être opaque

Incubation : \*48 h / \*\*3 à 4 jours / \*\*\*5 à 7 jours, 25 à 30 °C, atmosphère aérobie

## METHODE

### Matériaux fournis

**BD Sabouraud Glucose Agar** (milieu en flacons, partiellement complété). Voir **CONDITIONNEMENT** pour les volumes de remplissage et les conditionnements.

**STERILE** 

### Matériaux non fournis

Autoclave (réglé à 100 ± 2 °C), autocuiseur à vapeur ou plaque chauffante ; bain-marie (48 à 50 °C) ; verrerie et boîtes de Pétri en plastique stériles ou tubes stériles.

Réactifs et matériel de laboratoire auxiliaires requis.

### Préparation des réactifs

Liquéfier la gélose **BD Sabouraud Glucose Agar** (milieu en flacons) en la chauffant dans un autoclave ou un autocuiseur à vapeur. Le flacon peut également être placé dans un récipient adapté contenant de l'eau, mis sur une plaque chauffante et porté à ébullition. **Desserrer légèrement le bouchon avant de chauffer afin de permettre l'échange de pression.**

**Avertissement : Il n'est pas recommandé d'utiliser un four à micro-ondes pour liquéfier le milieu. Ne pas mettre de flacons munis de fermetures métalliques dans un micro-ondes.**

Si un autoclave est utilisé, régler la température à 100 ± 2 °C au maximum, car une chaleur excessive peut détériorer les composants et engendrer une performance microbiologique insuffisante. En cas d'utilisation d'une plaque chauffante et/ou d'un bain-marie, faire bouillir jusqu'à dissolution totale du milieu. Le temps d'ébullition nécessaire pour atteindre le stade de liquéfaction complète du milieu peut varier considérablement et dépend de plusieurs critères, tels que la température initiale de l'appareil, sa puissance, ses dimensions ou le volume et la température du milieu placé dans le récipient. Il est recommandé d'effectuer un test, et d'enregistrer ce délai après la première utilisation.

Après liquéfaction complète, retirer le récipient de l'appareil et le placer dans un bain-marie entre 48 et 50 °C.

**Avertissement : Porter des gants de protection contre la chaleur. Ne pas placer le récipient chaud dans un bain de glace ou dans l'eau froide pour accélérer le refroidissement car le verre pourrait se fissurer. Risque de brûlure sévère.**

Laisser refroidir le récipient dans le bain-marie le temps nécessaire pour permettre au milieu d'atteindre la température préréglée.

Si des suppléments sensibles à la chaleur sont ajoutés lors de la préparation d'un milieu en boîte de Pétri, la température du milieu ne doit pas dépasser 50 °C. Des agents antimicrobiens, tels que la gentamicine (0,04 g/L), le chloramphénicol (0,4 g/L), la tétracycline (0,1 g/L), ou la benzylpénicilline (0,1 g/L) peuvent être incorporés afin d'accroître la sélectivité. Dissoudre complètement les agents antimicrobiens dans un petit volume d'eau (10 à 15 mL), stériliser par filtration la solution et l'incorporer au milieu. Respecter des précautions d'asepsie lors de l'ajout du supplément et du remplissage des boîtes de Pétri. Utiliser des boîtes et des tubes stériles. Une fois le supplément ajouté, mélanger délicatement le milieu, en prenant soin de ne pas provoquer la formation de mousse ni de bulles.

Pour un ensemencement en surface, verser le milieu dans des boîtes de Pétri. Pour une boîte aux dimensions standard, entre 90 et 100 mm, un volume de 19 à 21 mL convient. Attendre que le milieu complété se solidifie, retourner les boîtes de Pétri et laisser sécher à température ambiante pendant la durée requise (pour obtenir une solidification complète du milieu, conserver pendant une nuit, entre 18 et 23 °C). Envelopper dans des sacs plastiques neufs et conserver entre 2 to 8 °C. Les boîtes de Pétri préparées avec ce milieu peuvent être utilisées pendant 5 à 7 jours.

Si la méthode du milieu coulé en boîtes de Pétri est utilisée, ajouter la matière à tester ou sa dilution dans la boîte vide, recouvrir avec le milieu, agiter doucement afin de mélanger les composants et attendre que le milieu se solidifie complètement.

Pour préparer des géloses inclinées en tubes, ajouter une quantité appropriée de milieu liquéfié (exempt de suppléments antibactériens) et refroidi entre 48 et 50 °C à l'intérieur des tubes, et laisser se solidifier avec l'inclinaison requise. Les tubes peuvent être utilisés pendant 2 à 3 semaines, dans la mesure où ils sont fermés hermétiquement et conservés dans l'obscurité à température ambiante, ou entre 2 et 8 °C.

Avant l'utilisation, les surfaces du milieu ne doivent pas être excessivement mouillées.

Ne pas liquéfier plus d'une fois un milieu fourni en flacons. Ne pas permettre aux excédents de se solidifier et de se liquéfier une deuxième fois, car un réchauffement répété détériore les composants du milieu et altère la performance microbiologique.

### **Types d'échantillons**

Le milieu non complété, coulé en boîtes de Pétri ou en tubes, est utilisé dans un grand nombre de procédures, notamment pour des tests pharmaceutiques. En microbiologie antibactérienne, le milieu non complété, tout comme le milieu complété avec des agents antibactériens et coulé en boîtes de Pétri, peut être utilisé pour l'isolement des champignons issus de tous les types d'échantillons cliniques. Le milieu en boîtes de Pétri complété avec de la gentamicine et du chloramphénicol doit être utilisé si les échantillons prélevés contiennent un grand nombre de contaminants bactériens. Pour plus d'informations sur le prélèvement et le traitement des échantillons, consulter les publications citées en référence.<sup>7,8</sup> Le milieu coulé dans des tubes ne doit pas être utilisé pour l'isolement de champignons directement à partir d'échantillons cliniques, mais uniquement pour la croissance et le prolongement de cultures fongiques.

### **Mode opératoire du test**

Les surfaces de gélose doivent être lisses et humides, mais sans excès d'humidité car cela pourrait provoquer l'apparition d'une croissance agglomérée.

Strier le milieu avec l'échantillon dès que possible après réception au laboratoire. La boîte d'étalement sert principalement à isoler des cultures pures à partir d'échantillons contenant une flore mixte. Si le prélèvement est mis en culture directement à partir d'un écouvillon, rouler l'écouvillon sur une petite partie de la gélose au niveau du bord de la boîte, puis strier la gélose à partir de cette zone ensemencée. Incuber les boîtes ou les tubes conformément aux

conditions choisies. Consulter les publications citées en référence pour plus d'informations sur le traitement et l'incubation des échantillons.<sup>2-8</sup>

Si ce milieu est utilisé pour la détection de levures (p. ex. *Candida* spp.) dans des échantillons cliniques, incubé pendant 48 h entre 30 et 35 °C. Si la matière est susceptible de contenir des champignons filamenteux, notamment des dermatophytes, incubé pendant une semaine, ou davantage si nécessaire, entre 25 et 30 °C. Les dermatophytes nécessitent parfois 3 semaines, voire plus, avant de produire une croissance. Si ce milieu est utilisé en contrôle sanitaire, incubé pendant 7 jours au maximum, entre 20 et 25 °C. Pour l'isolement de dermatophytes, utiliser également une gélose **BD Dermatophyte Agar**. Si la durée d'incubation dépasse les 3 jours, humidifier en conséquence. Les boîtes de Pétri peuvent être scellées avec du ruban adhésif afin d'éviter tout dessèchement. Pour plus d'informations sur la température de croissance et d'incubation, consulter les publications citées en référence.<sup>2-8</sup>

Le milieu cultivé en tubes inclinés est utilisé pour la culture et la conservation de cultures fongiques. Strier la souche directement, ou après suspension dans de l'eau stérilisée ou dans une solution saline, sur la totalité de la surface inclinée. Incuber l'isolat comme il convient. Pendant l'incubation, les bouchons doivent être desserrés légèrement afin d'assurer une ventilation. Refermer hermétiquement après l'incubation et pendant le stockage.

### Résultats

À l'issue de l'incubation, les boîtes peuvent présenter une zone de croissance agglomérée. La procédure de striation étant, en réalité, une technique de « dilution », des nombres décroissants de microorganismes sont progressivement déposés dans les zones striées. Par conséquent, une ou plusieurs de ces zones doivent présenter les colonies isolées des microorganismes contenus dans l'échantillon. En outre, la croissance de chaque microorganisme peut être évaluée de façon semi-quantitative sur la base de la croissance observée dans chacune des zones striées.

Dans la mesure où elles ont été ensemencées avec un inoculum approprié, les géloses inclinées présentent une croissance sur la totalité de leur surface. Les tubes ensemencés peuvent être réfrigérés pendant plusieurs mois sans perte de viabilité de la culture. Le temps de survie dépend des souches spécifiques.

Le nombre et les types de champignons se développant sur le milieu complété, préparé à partir de la **BD Sabouraud Glucose Agar** (milieu en flacons), sont très importants. C'est pourquoi aucun détail ne peut être fourni ici quant à leur morphologie. Consulter les publications citées en référence.<sup>2,4,8-10</sup>

Pour obtenir une différenciation et une identification approfondie des microorganismes, effectuer des repiquages appropriés à partir des isolats obtenus sur les différents milieux en boîtes.

### CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES ET LIMITES DE LA PROCEDURE

La **BD Sabouraud Glucose Agar** (milieux en flacons) est utilisée dans diverses procédures non cliniques.<sup>5,6</sup> En microbiologie clinique, le milieu en boîtes peut être utilisé pour l'isolement de champignons à partir de tous les types d'échantillons cliniques.<sup>2-4,8-10</sup>

Le milieu cultivé en tubes inclinés n'est pas utilisé directement avec des échantillons cliniques mais doit être employé uniquement pour le prolongement et la croissance de cultures pures de champignons.

Non complétement, le milieu n'est que faiblement sélectif ; par conséquent, des bactéries peuvent s'y développer, en particulier après une incubation prolongée. Si les échantillons, les matières ou les zones étudiées sont susceptibles de présenter une contamination bactérienne, le milieu doit être complété, avant son utilisation, avec des agents antimicrobiens, p. ex. gentamicine et chloramphénicol, tétracycline, benzylpénicilline, ou d'autres agents opportuns (voir **Préparation des réactifs**).

Compte tenu de l'importante plage de températures dans laquelle les champignons interviennent en tant qu'agents infectieux, il peut s'avérer nécessaire d'ensemencer plusieurs boîtes du même milieu et de les faire incuber à différentes températures. Consulter la rubrique **Mode opératoire du test** et les publications citées en référence.<sup>2,4,8,10</sup>

## REFERENCES

1. Sabouraud, R. 1892. Contribution a l'etude de la trichophytie humaine. Etude clinique, microscopique et bacteriologique sur la pluralité des trichophyton de l'homme. Ann. Dermatol. Syphil. 3: 1061-1087.
2. Haley, L.D., J. Trandel, and M.B. Coyle. 1980. Cumitech 11, Practical methods for culture and identification of fungi in the clinical microbiology laboratory. Coordinating ed., J.C. Sherris. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria. vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
4. Ajello, L., L.K. Georg, W. Kaplan, and L. Kaufman. 1963. CDC laboratory manual for medical mycology. PHS Publication No. 994, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
5. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. 2000. The U.S. Pharmacopeia 24/The national formulary 19-1999. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md.
6. Council of Europe, 2002. European Pharmacopoeia, 4th edition, and Supplement 4.2. 2002. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France.
7. Sutton, D.A. 2003. Specimen collection, transport, and processing: mycology. In: Murray, P.R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenenbaum (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Pfaller, M.A., and R.A. Tenenbaum (section ed.). 2003. Mycology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Downes, F.P., and K. Ito (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
10. Larone, D.H. 2002. Medically important fungi: a guide to identification. 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

## CONDITIONNEMENT

### BD Sabouraud Glucose Agar (milieux en flacons, partiellement complétés)

N° réf. 257104 12 unités par carton Volume de remplissage 250 mL ; en flacon plat de 300 mL  
N° réf. 257153 25 unités par carton Volume de remplissage 100 mL ; en flacon à sirop de 150 mL  
N° réf. 257261 4 unités par carton Volume de remplissage 400 mL ; en flacon de laboratoire de 500 mL

## INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

Pour plus d'informations, contacter le représentant local de BD.



BD Diagnostic Systems  
Tullastrasse 8 – 12  
D-69126 Heidelberg/Germany  
Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16  
Reception\_Germany@europe.bd.com

BD Diagnostic Systems Europe  
Becton Dickinson France SA  
11 rue Aristide Bergès  
38800 Le Pont de Claix/France  
Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 <http://www.bd.com>

BD, and BD logo are trademarks of Becton, Dickinson and Company.  
Bacto is a trademark of Difco Laboratories, division of Becton, Dickinson and Company.  
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.  
© 2003 Becton, Dickinson and Company