



BD Sabouraud Glucose Agar

USO PREVISTO

BD Sabouraud Glucose Agar (agar Sabouraud con glucosio), fornito in flaconi, è un terreno parzialmente completo usato per l'isolamento e la coltura di funghi (lieviti, muffe e dermatofiti) da materiali clinici e non clinici.

PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodo microbiologico.

L'agar Sabouraud con glucosio è stato allestito da Sabouraud per la coltura dei dermatofiti.^{1,2} Oggi, il terreno viene usato per l'isolamento e la coltura di tutti i funghi, inclusi quelli provenienti da campioni clinici.^{3,4} Il terreno inibisce lievemente i batteri contaminanti a causa del basso pH e dell'alta concentrazione di glucosio ed è inserito nella farmacopea statunitense tra i test per i limiti microbici.⁵ Con l'aggiunta di 100 mg di tetraciclina o 100 mg di sodio di benzilpenicillina per litro, il terreno risponde alle specifiche della farmacopea europea.⁶

BD Sabouraud Glucose Agar contiene neopeptone, che fornisce i fattori di crescita azotati. Il glucosio (destrosio) fornisce il carbonio e l'energia indispensabili per la crescita dei microrganismi. L'alta concentrazione di glucosio e il pH relativamente basso facilitano la crescita dei funghi, mentre numerosi batteri non tollerano l'elevata concentrazione di zuccheri e sono parzialmente inibiti dal basso pH. Senza l'aggiunta di antibiotici antibatterici, tuttavia, il terreno ha solo una scarsa selettività.

BD Sabouraud Glucose Agar è un terreno parzialmente completo (semi-finito) fornito in flacone, da cui è possibile ricavare un terreno su piastra o in provetta. Gli agenti antimicrobici, come gentamicina (0,04 g/L) e cloramfenicolo (0,4 g/L), tetraciclina (0,1 g/L) o benzilpenicillina (0,1 g/L), possono essere aggiunti prima del completamento per accrescere la selettività.

REAGENTI

BD Sabouraud Glucose Agar

Formula* per litro di acqua purificata

Neopeptone Bacto	5,0 g
Glucosio (destrosio)	40,0
Agar	19,0

pH 5,6 ± 0,2

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

PRECAUZIONI

IVD. Solo per uso professionale.

Non usare i flaconi se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazioni cromatiche, essiccamento, fessurazioni o altri segni di deterioramento. Per ultimare la preparazione di questo terreno parzialmente completo in flacone, seguire le tecniche previste e le avvertenze riportate nella sezione **PROCEDURA – Preparazione dei reagenti**. Per maneggiare i prodotti in condizioni asettiche, riconoscere i rischi biologici e smaltire i prodotti usati, consultare le **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**.

CONSERVAZIONE E VITA UTILE

Alla consegna, conservare i flaconi al buio a 5 – 25 °C. Evitare congelamento e surriscaldamento. Il terreno può essere utilizzato fino alla data di scadenza e incubato per il tempo consigliato. I flaconi prelevati dalle confezioni già aperte possono essere usati fino alla data di scadenza. I flaconi aperti devono essere utilizzati immediatamente. Liquefare il terreno prima di utilizzarlo per allestire le piastre o le provette. Non liquefare il terreno più di una volta dopo la solidificazione.

CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

Le piastre ottenute dal terreno semi-finito vengono inoculate con 10 – 100 UFC per piastra di ceppi di *C. albicans* e *A. niger*. Per *S. cerevisiae* e *T. mentagrophytes*, diluire dieci volte una sospensione secondo lo standard MacFarland 0,5 e inoculare 10 µL (circa 10³ UFC) per piastra. Per ulteriori informazioni, v. **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**. Incubare le piastre come indicato nella nota della tabella.

* <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Crescita da buona a eccellente
* <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCPF 1211 o DSM 1333	Crescita da buona a eccellente
** <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Crescita da buona a eccellente
*** <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	Crescita da buona a eccellente
Non inoculate	Ambra; il terreno in flacone può essere opaco

Incubazione - *48 h / **3 – 4 giorni / ***5 – 7 giorni a 25 – 30 °C in aerobiosi.

PROCEDURA

Materiali forniti

BD Sabouraud Glucose Agar (terreni parzialmente completi in flacone). V. **DISPONIBILITÀ** per i volumi di riempimento e le misure delle confezioni.

STERILE 

Materiali non forniti

Autoclave (regolata a 100 ± 2° C), pentola a vapore o piastra calda; bagnomaria (48 - 50°C); contenitori in vetro sterili e capsule di Petri o provette in plastica sterili.

Ulteriori reagenti e apparecchiature di laboratorio eventualmente occorrenti.

Preparazione dei reagenti

Liquefare **BD Sabouraud Glucose Agar** (terreni in flacone) riscaldando in autoclave o pentola a vapore. In alternativa, il flacone può essere posto in un recipiente adatto contenente acqua, collocato su una piastra calda e riscaldato fino ad ebollizione. **Prima di riscaldare, svitare leggermente il tappo per regolare la pressione.**

Avvertenza - Si sconsiglia di usare il forno a microonde per liquefare il terreno. Non introdurre nel forno a microonde flaconi con chiusure in metallo.

Se si adopera l'autoclave, regolare la temperatura a non più di 100 ± 2° C, in quanto il calore eccessivo può deteriorare gli ingredienti e compromettere le prestazioni microbiologiche. Se si usa una piastra calda e/o il bagnomaria, bollire per un tempo sufficiente a disciogliere tutto il terreno. Il tempo necessario per liquefare completamente il terreno può variare considerevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento prima dell'uso, dalla potenza elettrica, dalle dimensioni e dal volume del dispositivo, ma anche dalla temperatura del terreno nel contenitore. Si consiglia di verificare e registrare il tempo necessario per la liquefazione dopo il primo impiego.

Terminata la liquefazione, rimuovere il contenitore dal dispositivo di riscaldamento e metterlo a bagnomaria a 48 – 50 °C.

Avvertenza - Indossare guanti ignifughi. Non porre il contenitore ancora caldo nel ghiaccio o in acqua fredda per accelerarne il raffreddamento in quanto l'escursione termica potrebbe incrinare il vetro. Pericolo di ustioni.

Lasciare il contenitore a bagnomaria abbastanza a lungo per consentire il raffreddamento di tutto il terreno alla temperatura prestabilita.

Se la preparazione di un terreno su piastra richiede l'aggiunta di supplementi sensibili al calore, la temperatura del terreno non deve superare i 50 °C. Gli agenti antimicrobici, come gentamicina (0,04 g/L) e cloramfenicolo (0,4 g/L), tetraciclina (0,1 g/L) o benzilpenicillina (0,1 g/L), possono essere aggiunti per accrescere la selettività. Diluire completamente gli agenti antimicrobici in un piccolo volume (10 – 15 mL) di acqua, sterilizzare mediante filtrazione la soluzione e aggiungere al terreno. Mantenere condizioni asettiche durante l'aggiunta del supplemento e la preparazione delle piastre. Utilizzare piastre e provette sterili. Miscelare delicatamente il terreno dopo aver aggiunto il supplemento, evitando di formare schiuma e bolle.

Versare il terreno nelle piastre se si desidera un'inoculazione superficiale. Per una piastra normale da 90 – 100 mm, è adatto un volume di 19 – 21 mL. Lasciare solidificare il terreno completo, capovolgere le piastre e lasciarle essiccare a temperatura ambiente per un periodo di tempo adeguato (per solidificare completamente, conservare per una notte a 18 – 23 °C). Avvolgere in buste di plastica e conservare a 2 – 8 °C. Le piastre preparate con questo terreno possono essere utilizzate per 5 – 7 giorni.

Se si preferisce questa tecnica di allestimento delle piastre, aggiungere il materiale da esaminare o una sua diluizione nella piastra vuota, ricoprire con il terreno, ruotare la piastra delicatamente per miscelare e lasciare solidificare completamente.

Per la preparazione degli slant in provetta, aggiungere alle provette un quantitativo adeguato di terreno liquefatto (senza supplementi antibatterici), raffreddare a 48 – 50 °C e lasciare solidificare nella posizione inclinata desiderata. Le provette ben chiuse con tappi a vite possono essere utilizzate per 2 – 3 settimane se vengono conservate al buio a temperatura ambiente o a 2 – 8 °C.

Prima dell'uso, le superfici del terreno non devono essere troppo umide.

Liquefare il terreno in flacone solo una volta. Non lasciar che il materiale eventualmente rimasto si solidifichi né liquefarlo una seconda volta, in quanto il riscaldamento ripetuto danneggia gli ingredienti del terreno e compromette le prestazioni microbiologiche.

Tipi di campioni

Il terreno non arricchito, una volta versato nelle capsule di Petri o nelle provette, viene utilizzato in varie procedure, ad es. per i test farmacologici. In microbiologia clinica, sia il terreno non arricchito che il terreno arricchito con agenti antibatterici nelle capsule di Petri possono essere usati per l'isolamento dei funghi da tutti i tipi di campioni clinici. Se i campioni contengono numerosi contaminanti batterici, usare il terreno su piastra arricchito con gentamicina e cloramfenicolo. Per il prelievo e il trattamento dei campioni, consultare la bibliografia.^{7,8} Non utilizzare il terreno nelle provette per l'isolamento dei funghi direttamente dai campioni clinici, ma solo per la crescita e la conservazione delle colture micotiche.

Procedura del test

Le superfici dell'agar devono essere lisce e umide ma senza eccessiva umidità, che potrebbe far confluire la crescita.

Strisciare il campione quanto prima, non appena perviene in laboratorio. La piastra strisciata è usata prevalentemente per isolare colture pure da campioni contenenti flora mista. In alternativa, se il materiale viene posto in coltura direttamente da un tampone, passare il tampone su una piccola area della superficie del bordo e strisciare da questa area inoculata. Incubare le piastre o le provette nelle condizioni prescelte. Per ulteriori informazioni sul trattamento e l'incubazione dei campioni, consultare le relative voci della bibliografia.²⁻⁸

Per l'identificazione dei lieviti (ad es. *Candida* spp.) nei campioni clinici, incubare per 48 h a 30 – 35 °C. Se si sospetta la presenza di funghi filamentosi, inclusi i dermatofiti, incubare a 25 – 30 °C per una settimana o più a lungo. In alcuni casi, i dermatofiti possono richiedere anche più di 3 settimane per svilupparsi. Per le analisi igieniche, incubare a 20 – 25 °C fino a 7 giorni. Per isolare i dermatofiti, utilizzare anche **BD Dermatophyte Agar**. Se il terreno viene incubato per più di 3 giorni, mantenere un adeguato livello di umidità. Le piastre possono essere sigillate con nastro adesivo per evitare l'essiccamento. Per ulteriori informazioni sulla temperatura di crescita e l'incubazione, consultare la bibliografia.²⁻⁸

Gli slant in provetta sono utilizzati per la coltura e la conservazione delle colture micotiche. Strisciare il ceppo su tutta la superficie inclinata direttamente o previa sospensione in acqua sterile o soluzione fisiologica. Incubare in funzione delle caratteristiche dell'isolato. Durante l'incubazione, allentare leggermente i tappi per aerare. Dopo l'incubazione e durante la conservazione, chiudere bene i tappi.

Risultati

Dopo l'incubazione, le piastre possono evidenziare un'area di crescita confluyente. Poiché la procedura di striscio è in effetti una tecnica di "diluizione", nelle aree strisciate si deposita un

numero decrescente di microrganismi. Pertanto, una o più di queste aree presenteranno colonie isolate degli organismi contenuti nel campione. La crescita di ogni organismo, inoltre, può essere misurata in maniera semiquantitativa valutando la crescita nelle singole aree strisciate.

Gli slant, se inseminati con un inoculo adatto, mostrano la crescita sull'intera superficie. Le provette inoculate possono essere conservate in frigorifero per diversi mesi senza che le colture perdano vitalità. Il tempo di sopravvivenza dipende dai singoli ceppi.

Sui terreni completi ricavati da **BD Sabouraud Glucose Agar** (terreni in flacone) crescono numerosi e differenti tipi di funghi. Il loro aspetto, pertanto, non viene preso in esame in questa sede. Consultare la bibliografia.^{2,4,8-10}

Utilizzare gli isolati ottenuti sul terreno per eseguire le relative subcolture al fine di differenziare e identificare ulteriormente i funghi isolati.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

BD Sabouraud Glucose Agar (terreni in flacone) viene utilizzato per un'ampia gamma di procedure non cliniche.^{5,6} In microbiologia clinica, il terreno su piastra può essere usato per l'isolamento dei funghi da ogni tipo di campione clinico.^{2-4,8-10}

Lo slant in provetta non viene usato direttamente con i campioni clinici, ma solo per la conservazione e la crescita di colture micotiche pure.

Il terreno non arricchito è solo debolmente selettivo e possono crescervi i batteri, in particolare dopo un lungo periodo di incubazione. Se si sospetta che i campioni, i materiali o le aree in esame presentino contaminazione batterica, integrare il terreno con antibiotici antibatterici, ad es. gentamicina e cloramfenicolo, tetraciclina, benzilpenicillina o altri agenti, a seconda dei casi (v. **Preparazione dei reagenti**).

A causa delle differenti temperature di crescita dei funghi infettivi, può essere necessario inoculare numerose piastre dello stesso terreno e incubarle a diverse temperature. Consultare la sezione **Procedura del test** e le relative voci della bibliografia.^{2,4,8,10}

BIBLIOGRAFIA

1. Sabouraud, R. 1892. Contribution a l'etude de la trichophytie humaine. Etude clinique, microscopique et bacteriologique sur la pluralité des trichophytons 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. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Pfaller, M.A., and R.A. Tenover (section ed.). 2003. Mycology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (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.

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

BD Sabouraud Glucose Agar (terreni parzialmente completi in flacone)

N. di cat. 257104 12 flacone volume di riempimento 250 mL, in flacone piatto da 300 mL

N. di cat. 257153 25 flacone volume di riempimento 100 mL, in flacone per sciroppo da 150 mL

N. di cat. 257261 4 flacone volume di riempimento 400 mL, in flacone per laboratorio da 500 mL

ULTERIORI INFORMAZIONI

Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante BD di zona.



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