

BD Sabouraud Glucose Agar

VERWENDUNGSZWECK

BD Sabouraud Glucose Agar (BD Sabouraud-Glucose-Agar) in Flaschen ist ein halbfertiges Medium zur Isolierung und Kultivierung von Pilzen (Hefen, Schimmelpilzen und Dermatophyten) aus klinischen und nicht klinischen Materialien.

GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Mikrobiologische Methode.

Sabouraud-Glucose-Agar wurde von Sabouraud zur Kultivierung von Dermatophyten entwickelt.^{1,2} Heutzutage wird er zur Isolierung und Kultivierung aller Pilze, einschließlich jener aus klinischen Proben, verwendet.^{3,4} Das Medium wirkt auf Grund seines niedrigen pH-Wertes und der hohen Glucose-Konzentration auf kontaminierende Bakterien schwach hemmend. Es wird im USP im Rahmen der mikrobiologischen Grenzwerttests erwähnt.⁵ Ergänzt mit 100 mg Tetracyclin oder 100 mg Benzylpenicillin pro Liter, erfüllt das Medium die Spezifikationen der EP.⁶

In **BD Sabouraud Glucose Agar** agiert Neopepton als eine Quelle von stichstoffhaltigen Wachstumsfaktoren. Glucose (=Dextrose) liefert eine Kohlenstoff- und Energiequelle für das Wachstum von Mikroorganismen. Die hohe Glucose-Konzentration und der relativ niedrige pH-Wert stellen für das Wachstum der Pilze einen Vorteil dar, während viele Bakterien den hohen Zuckergehalt nicht tolerieren und vom niedrigen pH-Wert teilweise gehemmt werden. Ohne Ergänzung mit antibakteriellen Antibiotika zeigt das Medium nur eine schwache Selektivität.

BD Sabouraud Glucose Agar sind halbfertige Medien in Flaschen, aus welchen der Anwender Medienplatten oder –röhrchen zubereiten kann. Antimikrobielle Mittel, wie z.B. Gentamicin (0,04 g/L) und Chloramphenicol (0,4 g/L), Tetracyclin (0,1 g/L) oder Benzylpenicillin (0,1 g/L), können vor der Vervollständigung zugefügt werden, um die Selektivität zu erhöhen.

REAGENZIEN

BD Sabouraud Glucose Agar

Zusammensetzung* pro Liter destilliertem Wasser

Bacto Neopepton	5,0 g
Glucose (=Dextrose)	40,0
Agar	19,0

pH 5,6 ± 0,2

*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD . Nur für den professionellen Gebrauch.

Flaschen bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung, Rissen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden. Zur Vervollständigung dieses halbfertigen Flaschenmediums sind die unter **VERFAHREN – Vorbereitung der Reagenzien** beschriebenen Verfahren anzuwenden und die Warnungen zu berücksichtigen. Hinweise zu Verfahren aseptischer Arbeitsweise, Biogefährdung und Entsorgung des gebrauchten Produkts sind der **ALLGEMEINEN GEBRAUCHSANLEITUNG** zu entnehmen.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Flaschen nach Erhalt bei 5 – 25 °C im Dunkeln aufbewahren. Nicht einfrieren oder überhitzen. Das Medium kann bis zum Verfallsdatum verwendet und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden. Flaschen aus geöffneten Packungen können bis zum

Verfallsdatum verwendet werden. Geöffnete Flaschen sofort verwenden. Um aus dem Flaschenmedium Platten oder Röhrchen zuzubereiten, muss es zuerst verflüssigt werden. Medium nach dem Erstarren nicht mehr als einmal verflüssigen.

QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER

Aus diesem halbfertigen Medium zubereitete Platten werden mit 10 – 100 KBE der *C. albicans*- und *A. niger*-Stämme pro Platte inokuliert. Für *S. cerevisiae* und *T. metagrophytes* ist eine zehnfache Verdünnung einer auf den MacFarland-Standard 0,5 eingestellten Suspension zu verwenden und mit 10 µL (etwa 10³ KBE) pro Platte zu inokulieren. Für weitere Einzelheiten ist die ALLGEMEINE BEDIENUNGSANLEITUNG zu beachten. Platten gemäß den Angaben in der Fußnote der Tabelle inkubieren.

* <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Gutes bis ausgezeichnetes Wachstum
* <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCPF 1211 oder DSM 1333	Gutes bis ausgezeichnetes Wachstum
** <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Gutes bis ausgezeichnetes Wachstum
*** <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	Gutes bis ausgezeichnetes Wachstum
Nicht inokuliert	Bernsteinfarben; Flaschenmedium u.U. opak

Inkubation: * 48 h / ** 3 – 4 Tage / *** 5 – 7 Tage, 25 – 30 °C, aerob

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

BD Sabouraud Glucose Agar (halbfertige Flaschenmedien). Siehe **LIEFBARE PRODUKTE** für Füllmengen und Packungsgrößen.



Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Autoklav (auf 100 ± 2 °C eingestellt); Dampfkocher oder Heizplatte; Wasserbad (48 – 50 °C); sterile Glasbehälter und sterile Plastik-Petrischalen oder Röhrchen. Zusätzliche Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

Vorbereitung der Reagenzien

BD Sabouraud Glucose Agar (Flaschenmedien) durch Erhitzen in einem Autoklaven oder Dampfkocher verflüssigen. Alternativ kann die Flasche auch in einen geeigneten mit Wasser gefüllten Behälter gestellt werden, welcher auf eine Heizplatte gestellt und zum Kochen gebracht wird. **Vor dem Erhitzen Verschluss leicht lösen, um einen Druckausgleich zu ermöglichen.**

Warnung: Die Verwendung von Mikrowellengeräten zur Verflüssigung dieses Mediums wird nicht empfohlen. Medienflaschen mit Metallverschlüssen nicht in ein Mikrowellengerät stellen.

Bei Verwendung eines Autoklaven sollte die Temperatur nicht mehr als 100 ± 2 °C betragen, da übermäßiges Erhitzen die Bestandteile zersetzen kann, was unter Umständen zu einer ungenügenden mikrobiologischen Leistung führen kann. Wenn eine Heizplatte und/oder ein Wasserbad verwendet wird, Wasser so lange kochen, bis das Medium vollständig gelöst ist. Der benötigte Zeitraum bis zur vollständigen Verflüssigung des Mediums kann erheblich variieren und hängt von der eigentlichen Temperatur des Heizgerätes vor der Anwendung, von dessen Wattleistung und Größe ab, sowie von Volumen und Temperatur des Mediums im Behälter. Es wird empfohlen, einen Testlauf durchzuführen und die benötigte Zeit bis zur Verflüssigung nach der ersten Anwendung zu notieren.

Nach der vollständigen Verflüssigung wird der Behälter aus dem Heizgerät genommen und in ein Wasserbad von 48 – 50 °C gestellt.

Warnung: Wärmeschutzhandschuhe tragen! Den heißen Behälter nicht zur schnelleren Abkühlung in ein Eisbad oder in kaltes Wasser stellen, da dies zu Rissen im Glas führen könnte. Verbrühungsgefahr!

Den Behälter lange genug im Wasserbad belassen, bis das gesamte Medium auf die eingestellte Temperatur abgekühlt ist.

Falls hitzeempfindliche Zusätze zur Zubereitung eines Plattenmediums zugegeben werden, darf die Temperatur des Mediums 50 °C nicht übersteigen. Antibiotika, wie z.B. Gentamicin (0,04 g/L) und Chloramphenicol (0,4 g/L), Tetracyclin (0,1 g/L) oder Benzylpenicillin (0,1 g/L) können beigelegt werden, um die Selektivität zu erhöhen. Antibiotika in einer kleinen Menge Wasser (10 – 15 mL) vollständig auflösen, die Lösung filtersterilisieren und dem Medium beigegeben. Während der Zugabe des Zusatzes und beim Ausgießen der Platten sind aseptische Bedingungen einzuhalten. Sterile Petrischalen und Röhrrchen verwenden. Medium nach der Beifügung des Zusatzes sorgfältig mischen und dabei die Bildung von Schaum und Luftblasen vermeiden. Medium in die Petrischalen gießen, falls eine Oberflächeninokulierung erwünscht ist. Für eine normale 90 – 100 mm-Petrischale sind 19 – 21 mL ausreichend. Das ergänzte Medium erstarren lassen, die Platten umdrehen und bei Raumtemperatur hinreichend lange trocknen lassen (zur vollständigen Erstarrung Platten über Nacht bei 18 – 23 °C lagern). Platten in frische Plastikbeutel geben und bei 2 – 8 °C aufbewahren. Die vorbereiteten Platten mit diesem Medium können während 5 – 7 Tagen verwendet werden.

Wenn das Plattengussverfahren zu Anwendung kommen soll, das zu testende Material oder seine Verdünnung in die leere Petrischale geben und mit dem Medium bedecken. Petrischale leicht rotieren, um das Material zu mischen, und danach vollständig erstarren lassen.

Für die Zubereitung von Schrägagar in Röhrrchen die geeignete Menge des verflüssigten, auf 48 – 50 °C abgekühlten Mediums (ohne antibakterielle Zusätze) in die Röhrrchen geben und in der gewünschten Schräglage erstarren lassen. Mit Schraubverschlüssen fest verschlossen und im Dunkeln bei Raumtemperatur oder 2 – 8 °C aufbewahrt, können die Röhrrchen während 2 – 3 Wochen verwendet werden.

Vor der Anwendung darf die Oberfläche des Mediums nicht übermäßig nass sein.

Flaschenmedium nur einmal verflüssigen. Mögliches Restmedium nicht erstarren lassen und ein zweites Mal verflüssigen, das wiederholtes Erhitzen die Bestandteile des Mediums schädigt, was zu einer unzureichenden mikrobiologischen Leistung führt.

Probenarten

Das nicht ergänzte, in Petrischalen oder Röhrrchen gegossene Medium wird in einer Vielzahl von Verfahren verwendet, z.B. für pharmazeutische Untersuchungen. In der klinischen Mikrobiologie kann sowohl das nicht ergänzte Medium, als auch das mit antibakteriellen Mitteln ergänzte Medium in Petrischalen zur Isolierung von Pilzen aus allen klinischen Probenarten verwendet werden. Das mit Gentamicin und Chloramphenicol ergänzte Plattenmedium sollte verwendet werden, wenn die Proben eine große Anzahl bakterielle Kontaminanten erhalten. Betreffend Entnahme und Verarbeitung der Proben sind die Literaturhinweise zu beachten.^{7,8} Das in Röhrrchen abgefüllte Medium darf nicht zur direkten Isolierung von Pilzen aus klinischen Proben verwendet werden, sondern nur zum Wachstum und zur Erhaltung von Pilzkulturen.

Testverfahren

Die Agarflächen sollten glatt und feucht sein, jedoch ohne überschüssige Nässe, was zu konfluierendem Wachstum führen könnte.

Die Probe nach dem Eintreffen im Labor so bald wie möglich ausstreichen. Die Ausstrichplatte dient primär zur Isolierung von Reinkulturen aus Proben mit Mischflora. Wenn das Material direkt von einem Abstrich kultiviert wird, alternativ den Abstrichupfer über einen kleinen Oberflächenbereich am Rand rollen; dann von diesem inokulierten Bereich aus ausstreichen. Platten oder Röhrrchen unter den gewählten Bedingungen inkubieren. Nähere Angaben zur Verarbeitung und Inkubation von Proben sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.²⁻⁸

Bei Verwendung für den Nachweis von Hefen (z.B. *Candida*-Spezies) in klinischen Proben 48 h bei 30 – 35 °C inkubieren. Bei Verdacht auf filamentöse Pilze, einschließlich Dermatophyten, eine Woche oder länger bei 25 – 30 °C inkubieren. Dermatophyten benötigen gelegentlich 3 Wochen oder länger, um ein Wachstum zu produzieren. Bei der Verwendung zur Hygieneüberwachung, bis zu 7 Tage bei 20 – 25 °C inkubieren. Für die Isolierung von Dermatophyten sollte außerdem **BD Dermatophyte Agar** verwendet werden. Bei einer Inkubationszeit von mehr als 3 Tagen muss für ausreichend Feuchtigkeit gesorgt werden. Die Platten können mit Klebeband seitlich verschlossen werden, um ein Austrocknen zu verhindern.

Detaillierte Informationen zur Wachstumstemperatur und Inkubation enthält die entsprechende Literatur.²⁻⁸

Das Schrägar-Medium in Röhrchen wird zur Kultivierung und Erhaltung von Pilzkulturen verwendet. Den Stamm direkt oder nach Suspension in Sterilwasser oder Salzlösung auf die gesamte Schrägagar-Oberfläche ausstreichen. Für das Isolat passend inkubieren. Während der Inkubation kann der Verschluss leicht gelöst werden, um eine Belüftung zu ermöglichen. Nach der Inkubation und während der Lagerung Röhrchen komplett verschließen.

Ergebnisse

Nach der Inkubation können die Platten einen Bereich mit konfluierendem Wachstum aufweisen. Da es sich bei dem Ausstrichverfahren eigentlich um eine „Verdünnungsmethode“ handelt, werden geringere Mengen von Mikroorganismen auf den Ausstrichbereichen abgelagert. Folglich sollte(n) einer oder mehrere dieser Bereiche isolierte Kolonien der in der Probe enthaltenen Organismen aufweisen. Außerdem kann das Wachstum jedes Organismus auf der Basis des Wachstums in jedem der ausgestrichenen Bereiche semiquantitativ bestimmt werden.

Mit einem geeignetem Inokulum inokuliert, zeigt die gesamte Oberfläche des Schrägagars Wachstum. Inokulierte Röhrchen können für mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden, ohne dass die Kultur an Lebensfähigkeit verliert. Die Überlebenszeit hängt von den jeweiligen Stämmen ab.

Die Anzahl und Artenvielfalt der auf Sabouraud Glucose Agar (Flaschenmedien) zubereiteten fertigen Medien wachsenden Pilzen ist sehr groß. Aus diesem Grund können hier keine weiteren Einzelheiten zu ihrem Erscheinungsbild angegeben werden. Die Literaturhinweise sind zu beachten.^{2,4,8-10}

Von den auf den Plattenmedien erhaltenen Isolaten müssen geeignete Subkulturen angelegt werden, um eine weitere Differenzierung und Identifizierung der isolierten Pilze zu ermöglichen.

LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

BD Sabouraud Glucose Agar (Flaschenmedien) wird in einer Vielzahl nicht klinischer Verfahren verwendet.^{5,6} In der klinischen Mikrobiologie kann das Plattenmedium zur Isolierung von Pilzen aus allen klinischen Probenarten verwendet werden.^{2-4,8-10}

Das Schrägagar-Medium in Röhrchen wird nicht direkt mit klinischen Proben verwendet, sondern nur zur Erhaltung und zum Wachstum von reinen Pilzkulturen.

Das nicht ergänzte Medium ist nur schwach selektiv; deshalb können auch Bakterien Wachstum zeigen, insbesondere nach längeren Inkubationszeiten. Bei Verdacht auf bakterielle Kontamination der Proben, der Materialien oder der untersuchten Bereiche sollte das Medium vor der Anwendung mit antibakteriellen Antibiotika, z.B. Gentamicin und Chloramphenicol, Tetracyclin, Benzylpenicillin oder anderen (siehe **Vorbereitung der Reagenzien**) nach Bedarf ergänzt werden.

Auf Grund des breiten Wachstumstemperaturbereiches von als Infektionserregern auftretenden Pilzen kann es nötig sein, verschiedene Platten desselben Mediums zu inokulieren und sie bei unterschiedlichen Temperaturen zu inkubieren. Der Abschnitt **Testverfahren** und die geeigneten Literaturhinweise sind zu beachten.^{2,4,8,10}

LITERATUR

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. 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.

VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

BD Sabouraud Glucose Agar (halbfertige Flaschenmedien)

Best.-Nr. 257104	12 Flaschen	250 mL Füllmenge; in 300 mL Flachflasche
Best.-Nr. 257153	25 Flaschen	100 mL Füllmenge; in 150 mL Sirupflasche
Best.-Nr. 257261	4 Flaschen	400 mL Füllmenge; in 500 mL Laborflasche

WEITERE INFORMATIONEN

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung.



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