

BD Sabouraud Glucose Agar

TILSIGTET BRUG

BD Sabouraud Glucose Agar (glukoseagar), der leveres i flasker, er et delvis færdigt medium, der bruges til isolering og dyrkning af fungi svampe (gærsvampe, skimmelsvampe og dermatofyter) fra kliniske og ikke-kliniske materialer.

PROCEDURENS PRINCIPPER OG FORKLARING

Mikrobiologisk metode.

Sabouraud glukoseagar blev udtænkt af Sabouraud til dyrkning af dermatofyter.^{1,2} I dag bruges den til isolering og dyrkning af alle fungi svampe, inklusiv de svampe, der kommer fra kliniske præparater.^{3,4} Mediet er let hæmmende for kontaminerende bakterier på grund af dets lave pH og den høje glukosekoncentration. Det er nævnt i USP i de mikrobielle grænsetests.⁵ Når det tilsættes 100 mg tetracyclin eller 100 mg benzylpenicillinnatrium pr. liter medium, opfylder mediet specifikationen i EP.⁶

I **BD Sabouraud Glucose Agar** er neopepton en kilde til nitrogenholdige vækstfaktorer. Glukose (=dextrose) leverer en kulstof- og energikilde til væksten af mikroorganismer. Den høje glukosekoncentration og den relativt lave pH er fordelagtige for væksten af fungi svampe, mens mange bakterier ikke tåler den høje sukkerkoncentration og delvis hæmmes af den lave pH. Uden tilsætning af antibakterielle antimikrober har mediet imidlertid kun en svag selektivitet.

BD Sabouraud Glucose Agar er delvis færdige (=halvfærdige) medier leveret på flasker, hvorfra brugeren kan præparere plade- eller glasmedier. Antimikrobielle stoffer som fx gentamicin (0,04 g/L) og chloramphenicol (0,4 g/L), tetracyclin (0,1 g/L) eller benzylpenicillin (0,1 g/L), kan tilsættes inden færdiggørelsen for at øge selektiviteten.

REAGENSER

BD Sabouraud Glucose Agar

Formel* pr. liter oprenset vand

Bacto neopepton	5,0 g
Glukose (=Dextrose)	40,0
Agar	19,0

pH 5,6 ± 0,2

*Justeret og/eller suppleret som påkrævet for at opfylde funktionskriterier.

FORHOLDSREGLER

IVD

. Kun til professionel brug.

Flaskerne må ikke anvendes, hvis de viser tegn på mikrobiel kontaminering, misfarvning, udtørring, brud eller andre tegn på forringelse. Til færdiggørelse af dette delvis færdige flaskemedium følges metoderne og overholdes advarslerne, der er beskrevet under

PROCEDURE – Klargøring af reagens. Læs dokumentet **GENEREL BRUGSANVISNING** for procedurer om aseptisk håndtering, biologisk risiko og bortskaffelse af det brugte produkt.

OPBEVARING OG HOLDBARHED

Flaskerne skal straks efter modtagelse opbevares i mørke ved 5 til 25 °C. Undgå nedfrysning og overophedning. Mediet må bruges op til udløbsdatoen og inkuberes i de anbefalede inkubationstider. Flasker fra åbnede pakninger kan anvendes op til udløbsdatoen. Åbnede flasker skal bruges med det samme. For at præparere plader eller glas med flaskemediet skal det først gøres flydende. Mediet må kun gøres flydende én gang efter størkning.

BRUGERKVALITETSKONTROL

Plader, der præpareres fra det halvferdige medium, inokuleres med 10 til 100 CFU pr. plade af *C. albicans* og *A. niger* stammer. For *S. cerevisiae* og *T. mentagrophytes* bruges en tifold fortynding af en suspension, der er justeret til en MacFarland 0,5 standard, og der inokuleres 10 µL (ca. 10³ CFU) pr. plade. Se dokumentet **GENEREL BRUGSANVISNING** for at få yderligere detaljer. Inkubér pladerne som angivet i fodnoten under tabellen.

* <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Vækst er god til fortræffelig
* <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCPF 1211 eller DSM 1333	Vækst er god til fortræffelig
** <i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	Vækst er god til fortræffelig
*** <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	Vækst er god til fortræffelig
Ikke-inokuleret	Ravgul; flaskemedium kan være uigennemsigtig

Inkubation: *48 h / **3 til 4 dage / ***5 til 7 dage, 25 °C – 30 °C, aerobt

PROCEDURE

Vedlagte materialer

BD Sabouraud Glucose Agar (delvis færdige flaskemedier). Se **BESTILLING** for opfyldningsvolumener og pakningsstørrelse.



Materialer, der ikke er vedlagt

Autoklave (indstillet til 100 ± 2 °C), dampkoger eller varmeplade; vandbad (48–50 °C); sterile glasartikler og sterile petriskåle eller glas af plastic.

Hjælpereagenser og laboratorieudstyr som påkrævet.

Klargøring af reagens

Gør **BD Sabouraud Glucose Agar** (flaskemedier) flydende ved at varme den i en autoklave eller en dampkoger. Alternativt kan flasken anbringes i et egnet kar indeholdende vand, som sættes på en varmeplade og bringes i kog. **Løsn hættten lidt inden opvarmning for at tillade trykudligning.**

Advarsel: Det anbefales ikke at bruge mikrobølgeovne til forflydning af mediet.

Medieflasker med metallukkeanordninger må ikke anbringes i en mikrobølgeovn.

Når der bruges autoklave, indstilles temperaturen til højst 100 ± 2 °C, da overdreven opvarmning kan nedbryde ingredienserne og muligvis føre til utilfredsstillende mikrobiologisk ydelse. Når en varmeplade og/eller et vandbad bruges, koges tilstrækkeligt længe til at opløse hele mediet. Den tid, der er nødvendig for fuldstændig forflydning af mediet, kan variere betragteligt og afhænger af opvarmningsapparatets faktiske temperatur inden brug, dets wattkapacitet, størrelse og volumen og temperatur af mediet i beholderen. Det anbefales at teste og registrere den tid, der er nødvendig til forflydning, efter første brug.

Efter fuldstændig forflydning tages beholderen af opvarmerapparatet og anbringes i et vandbad, der er indstillet til 48 til 50 °C.

Advarsel: Benyt varmebestandige handsker! Den varme beholder må ikke anbringes i et isbad eller i koldt vand for at fremskynde afkøling, da dette kan forårsage revner i glasset.

Risiko for alvorlig skoldning!

Lad beholderen stå i vandbadet tilstrækkeligt længe til at tillade afkøling af det færdige medium til den indstillede temperatur.

Hvis varmfølsomme supplementer tilsættes præparationen af et plademedium, må temperaturen på mediet ikke være højere end 50 °C. Antimikrobielle stoffer som fx gentamicin (0,04 g/L) og chloramphenicol (0,4 g/L), tetracyclin (0,1 g/L) eller benzylpenicillin (0,1 g/L), kan tilsættes inden færdiggørelsen for at øge selektiviteten. Opløs antimikroberne fuldstændigt i et lille volumen (10 til 15 mL) vand, sterilisér opløsningen ved hjælp af filtrering og tilsæt det til mediet. Anvend aseptiske forhold under tilsætning af supplementet og under ophældning i

pladerne! Brug sterile skåle og glas. Bland mediet forsigtigt efter tilsætning af supplementet, men undgå skum- og bobledannelse.

Hæld mediet op i skålene, hvis overflade inokulering ønskes. Til en normal 90 til 100 mm skål er 19 til 21 mL et passende volumen. Lad det færdige medium størkne, vend pladerne om og lad dem tørre ved stuetemperatur i et passende tidsrum (for at opnå fuldstændig størkning skal de stå natten over ved 18 til 23 °C). Pak dem ind i friske plasticposer og opbevar dem ved 2 til 8 °C. Præparerede plader med dette medium kan bruges i op til 5 til 7 dage.

Hvis metoden med ophældning i plader skal anvendes, tilsættes det materiale, der skal testes eller fortynding heraf, til den tomme skål, dæk det til med mediet, rotér skålen forsigtigt for at blande og lad det størkne fuldstændigt.

Til præparering af skrånede medier i glas tilsættes den rette mængde flydende medium (uden antibakterielle supplement), afkølet til 48 til 50 °C, til glassene og lad dem størkne til den ønskede skrånede position. Glassene kan, når de lukkes tæt til med skruehætter, bruges i 2 til 3 uger, når de opbevares i mørke ved stuetemperatur eller ved 2 – 8 °C.

Inden brug må mediets overflader ikke være overdrevent våde.

Flaskemediet må kun gøres flydende én gang. Lad ikke tiloversblevne rester størkne og derefter blive flydende for anden gang, da gentagen opvarmning vil beskadige ingredienserne i mediet, hvilket kan føre til utilfredsstillende mikrobiologisk ydelse.

Prøvetyper

Det ikke-supplerede medium, ophældt i petriskåle eller glas, bruges i en række forskellige procedurer, fx til farmaceutiske tests. I klinisk mikrobiologi kan både ikke-suppleret medium og medium suppleret med antibakterielle stoffer i petriskåle bruges til isolering af fungi svampe fra alle typer kliniske præparater. Plademediet suppleret med gentamicin og chloramphenicol bør bruges, hvis præparaterne indeholder et stort antal bakteriekontaminanter. Til opsamling og bearbejdning af præparater læses i litteraturhenvisningerne.^{7,8} Medium fyldt i glas må ikke bruges til isolering af fungi svampe direkte fra kliniske præparater, men bruges til vækst og vedligeholdelse af svampekulturer alene.

Testprocedure

Agaroverflader skal være glatte og fugtige, men uden overdreven fugt, som kan forårsage sammenflydende vækst.

Udstryg prøven så hurtigt som muligt efter modtagelse i laboratoriet. Udstrygningspladen anvendes primært til at isolere rene kulturer fra prøver, der indeholder blandet flora. Alternativt, hvis materialet dyrkes direkte fra en podedepind, kan podedepinden rulles over et lille område på overfladen ved kanten. Derefter stryges ud fra dette inokulerede område. Inkubér pladerne eller glassene under de valgte forhold. Se den relevante litteratur for yderligere oplysninger om bearbejdning og inkubation af præparater.²⁻⁸

Hvis de bruges til påvisning af gærsvampe (fx *Candida* arter) i kliniske præparater, inkuberes i 48 h ved 30 til 35 °C. Hvis der er mistanke om filiforme fungi svampe, herunder dermatofyter, inkuberes i en uge ved 25 til 30 °C eller længere. Dermatofyter kræver af og til 3 uger eller mere til at give vækst. Hvis de bruges til overvågning af hygiejne, inkuberes i op til 7 dage ved 20 til 25 °C. Til isolering af dermatofyter bør **BD Dermatophyte Agar** (dermatofytagar) også bruges. Hvis de inkuberes i mere end 3 dage, skal der tilføres tilstrækkelig fugt. Pladerne kan forsegles med plastictape for at undgå udtørring. Læs litteraturlisten for oplysninger om væksttemperatur og inkubation.²⁻⁸

Det skrånede medium i glas bruges til dyrkning og vedligeholdelse af svampekulturer. Udstryg stammen direkte efter suspension i sterilt vand eller saltvand på hele den skrånede overflade. Inkubér som relevant for isolatet. Under inkubation bør hætterne være løsnet lidt for at tillade udluftning. Efter inkubation og under opbevaring lukkes de helt til.

Resultater

Efter inkubation kan de fleste plader vise et område med sammenflydende vækst. Fordi udstrygningsproceduren faktisk er en "fortyndings"-teknik, reduceres antallet af mikroorganismer på de udstrøgne områder. Som følge heraf bør et eller flere af disse områder

udvise isolerede kolonier af organismerne indeholdt i præparatet. Desuden kan vækst af hver organisme scores semikvantitativt på basis af vækst i hvert af de udstrøgne områder.

Hvis de inokuleres med et passende inokulum vil de skråstivnede medier vise vækst på hele overfladen. Inokulerede glas kan opbevares i køleskab i mange måneder uden at kulturen mister levedygtighed. Overlevelsestiden afhænger af de enkelte stammer.

Antallet og typer af fungi svampe, der vokser på de færdige medier præpareret fra **BD Sabouraud Glucose Agar** (flaskemedier) er meget stort. Derfor kan der ikke gives specifikke oplysninger om deres udseende her. Læs litteraturen.^{2,4,8-10}

Ud fra de isolater, der opnås fra plademediet, bør der opstilles relevante underkulturer for at give mulighed for yderligere differentiering og identifikation af de isolerede fungi svampe.

FUNKTIONSDATA OG PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

BD Sabouraud Glucose Agar (flaskemedier) bruges i en lang række ikke-kliniske procedurer.^{5,6} I klinisk mikrobiologi kan plademediet bruges til isolering af fungi svampe fra alle typer kliniske præparater.^{2-4,8-10}

Det skråstivnede medium i glas bruges ikke direkte med kliniske præparater, men bruges til vedligeholdelse og vækst af rene svampekulturer alene.

Det ikke-supplerede medium er kun svagt selektivt; derfor kan bakterier vokse, især efter forlænget inkubation. Hvis bakteriekontaminering af præparaterne, materialerne eller områder under undersøgelsen mistænkes, bør mediet suppleres inden brug med antibakterielle antimikrober, fx gentamicin og chloramphenicol, tetracyclin, benzylpenicillin eller andre, som det er passende (se **Klargøring af reagens**).

På grund af det brede væksttemperaturområde af svampe, der forekommer som smitsomme stoffer, kan det være nødvendigt at inokulere mange plader af det samme medium og inkubere dem ved forskellige temperaturer. Læs afsnittet **Testprocedure** og relevant litteratur.^{2,4,8,10}

LITTERATUR

1. Sabouraud, R. 1892. Contribution a l'etude de la trichophytie humaine. Etude clinique, microscopique et bacteriologique sur la pluralité des trichophytens 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.

EMBALLERING/BESTILLING

BD Sabouraud Glucose Agar (delvis færdige flaskemedier)

Kat. nr. 257104	cpu 12	250 mL opfyldningsvolumen; i 300 mL flad flaske
Kat. nr. 257153	cpu 25	100 mL opfyldningsvolumen; i 150 mL sirupflaske
Kat. nr. 257261	cpu 4	400 mL opfyldningsvolumen; i 500 mL laboratorief flaske

YDERLIGERE OPLYSNINGER

Kontakt den lokale BD repræsentant angående yderligere oplysninger.



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