

BD Sabouraud Glucose Agar

AVSEDD ANVÄNDNING

BD Sabouraud Glucose Agar som tillhandahålls i flaskor, är ett delvis färdigställt medium som används för isolering och odling av svampar (jästsvamp, mögelsvamp och dermatofyter) från kliniska och icke-kliniska material.

PRINCIPER FÖR OCH FÖRKLARING AV METODEN

Mikrobiologisk metod.

Sabouraud glukosagar framställdes ursprungligen av Sabouraud för odling av dermatofyter.^{1,2} Numera används den för isolering och odling av alla svampar, inklusive sådana från kliniska prover.^{3,4} Mediet verkar svagt hämmande på kontaminerande bakterier på grund av sitt låga pH och sin höga glukoskoncentration. Det omnämns i den amerikanska farmakopén (USP) avseende mikrobiella gränsanalyser.⁵ Vid tillsats av 100 mg tetracyclin eller 100 mg bensylpenicillin-natrium per liter medium uppfyller mediet specifikationen i den europeiska farmakopén (EP).⁶

I **BD Sabouraud Glucose Agar** utgör Neopeptone en källa till kvävehaltiga tillväxtfaktorer. Glukos (=dextros) utgör en kol- och energikälla för tillväxt av mikroorganismer. Den höga glukos-koncentrationen och det förhållandevis låga pH-värdet gynnar tillväxt av svamp, medan många bakterier inte tolererar den höga sockerkoncentrationen och inhiberas av det låga pH-värdet. Utan tillsats av antibakteriella antimikroba medel uppvisar mediet dock endast en svag selektivitet.

BD Sabouraud Glucose Agar är delvis färdigställda (=halvfärdiga) medier som tillhandahålls i flaskor ur vilka användaren kan bereda medier på plattor eller i rör. Antimikroba medel som gentamicin (0,04 g/L) och kloramfenikol (0,4 g/L), tetracyclin (0,1 g/L), eller bensylpenicillin (0,1 g/L), kan tillsättas före färdigställandet för att öka selektiviteten.

REAGENSER

BD Sabouraud Glucose Agar

Sammansättning* per liter aqua purif.

Bacto Neopeptone	5,0 g
Glukos (=Dextros)	40,0
Agar	19,0

pH 5,6 ± 0,2

*Justerad och/eller kompletterad efter behov för att uppfylla prestandakriterierna.

FÖRSIKTIGHETSBEAKTANDEN

IVD . Endast för professionellt bruk.

Flaskor får inte användas om de visar tecken på mikrobiell kontamination, missfärgning, uttorkning, sprickbildning eller andra tecken på försämring. För färdigställande av detta delvis färdigställda medium på flaska ska metoderna och varningarna som beskrivs under **FÖRFARANDE – Reagensberedning** följas. Se skriften **ALLMÄNNA INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDNING** för information om aseptiska förfaranden vid hantering, biorisker och bortskaffning av använd produkt.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET

Förvara flaskorna mörkt vid 5 till 25 °C efter mottagandet. Undvik frysning och överhettning. Mediet kan användas fram till utgångsdatum och inkuberas under rekommenderad

inkuberingsperiod. Flaskor från öppnade förpackningar kan användas fram till utgångsdatum. Öppnade flaskor måste användas omedelbart. För att bereda plattor eller rör från flaskmediet, måste detta först omvandlas till vätska. Mediet ska inte omvandlas till vätskeform fler än en gång efter att det stelnat.

KVALITETSKONTROLL UTFÖRD AV ANVÄNDAREN

Plattor färdigställda från det halvfärdiga mediet inokuleras med 10 till 100 cfu per platta av stammarna *C. albicans* A. *niger*. För *S. cerevisiae* och *T. mentagrophytes*, ska en tiofaldig spädning av en suspension justerad till MacFarland 0,5 standard användas och varje platta inokuleras med 10 µl (ca 10³ CFU). För vidare information, se dokumentet **ALLMÄNNA INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDNING**. Inkubera plattorna enligt fotnoterna i tabellen.

* <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	God till utmärkt växt
* <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCPF 1211 eller DSM 1333	God till utmärkt växt
** <i>Aspergillus niger</i> ATCC16404	God till utmärkt växt
*** <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	God till utmärkt växt
Ej inokulerad	Bärnstensfärg; flaskmedium kan vara ogenomskinligt

Inkubering: *48 h / **3 till 4 dagar / ***5 till 7 dagar, 25 °C - 28 °C, aerobt

FÖRFARANDE

Tillhandahållet material

BD Sabouraud Glucose Agar (delvis färdigställt medium i flaska). Se **TILLGÄNGLIGHET** för fyllningsvolym och förpackningsstorlekar.



Material som ej medföljer

Autoklav (sätt på 100 ± 2 °C), ångkokare eller värmeplatta; vattenbad (48 – 50 °C); sterila glasbehållare och sterila Petriskålar eller rör i plast. Extra reagenser och laboratorieutrustning efter behov.

Reagensberedning

Omvandla **BD Sabouraud Glucose Agar** (medier på flaska) till vätska genom att värma den i en autoklav eller ångkokare. Flaskan kan även ställas i en lämplig behållare med vatten som placeras på en värmeplatta för att låta vattnet koka. **Lossa på locket något före upphettning för att tillåta tryckutjämning.**

Varning: användning av mikrovågsugn rekommenderas inte för omvandling av mediet till vätska. Sätt inte flaskor med medium med metallock i mikrovågsugn.

Om en autoklav används ska temperaturen sättas på högst 100 +/- 2 °C, eftersom för hög värme kan förstöra ingredienserna och eventuellt leda till sämre mikrobiologiska resultat. Om värmeplatta och/eller vattenbad används ska kokningen pågå tillräckligt länge så att allt medium övergår till vätskeform. Tidsåtgången till fullständig omvandling till vätska kan variera väsentligt och beror på uppvärmningsanordningens faktiska temperatur före användning, effekt, storlek samt mängden medium och dess temperatur i behållaren. Det rekommenderas att tidsåtgången för omvandling till vätska testas och antecknas vid första tillfället. Efter fullständig omvandling till vätska ska behållaren avlägsnas från uppvärmningsanordningen och sättas i ett vattenbad med temperatur 48 to 50 °C.

Varning: Bär värmefärdiga handskar! Sätt inte den heta behållaren i ett isbad eller i kallt vatten för att påskynda avkylningen eftersom det kan göra att glaset spricker. Risk för allvarlig brännskada!

Låt behållaren stå i vattenbadet tillräckligt länge så att det färdigställda mediet svalnar till inställd temperatur.

Om värmekänsliga tillsatser används för att bereda ett plattmedium, får mediets temperatur inte överstiga 50 °C. Antimikroba medel som gentamicin (0,04 g/L) och kloramfenikol (0,4 g/L),

tetracyclin (0,1 g/L) eller bensylpenicillin (0,1 g/L) kan tillsättas för att öka selektiviteten. Lös upp de antimikroba medlen fullständigt i en liten mängd (10 till 15 mL) vatten, filtersterilisera lösningen och tillsätt till mediet. Använd aseptisk teknik när tillsatsen sätts till mediet och vid upphållning på plattor! Använd sterila skålar och rör. Blanda mediet försiktigt efter tillsatsen tillförts, men undvik att skum eller bubblor bildas.

Håll mediet på plattorna om inokulering på ytan önskas. För en vanlig skål på 90 till 100 mm är 19 till 21 mL en lagom volym. Låt det färdigställda mediet stelna, vänd plattorna och låt torka i rumstemperatur tillräckligt länge (för att plattorna ska stelna helt, låt stå över natt i 18 till 23 °C). Lägg i nya plastpåsar och förvara vid 2 to 8 °C. Färdiga plattor med detta medium kan användas i 5 till 7 dagar.

Om plattgjutningsmetoden ska användas, ska materialet som ska testas eller en spädning därav tillsättas i en tom skål. Håll över medium, vrid plattan försiktigt för att blanda och låt stelna helt.

För beredning av skivor i rör, tillsätt korrekt mängd medium i vätskeform (utan antimikroba tillsatser) avkylt till 48 till 50 °C i rören och låt stelna helt i önskat snedläge. Tätt förslutna rör med skruvlock kan användas i 2 till 3 veckor om de förvaras mörkt och i rumstemperatur eller vid 2 to 8 °C.

Mediets ytor får inte vara för våta innan användning.

Medium på flaska ska endast omvandlas till vätska en gång. Stelnade rester ska inte omvandlas till vätska en andra gång eftersom upprepad uppvärmning förstör ingredienserna i mediet, vilket leder till otillfredsställande mikrobiologiska resultat.

Provytyper

Medium utan tillsats som hålls i Petriskålar eller i rör har ett antal olika användningsområden, t.ex. för läkemedelstester. Inom klinisk mikrobiologi kan både medium utan tillsats och medium med tillsats av antimikroba medel i Petriskålar användas för isolering av svampar från alla typer av kliniska prover. Plattmedium med tillsats av genatmicin och kloramfenikol ska användas om proverna innehåller stora mängder bakteriella kontaminanter. För provtagning och provbehandling, se referenserna.^{7,8} Medium i rör får inte användas för isolering av svamp direkt från kliniska prover, utan ska endast användas för tillväxt och underhåll av svampkulturer.

Testförfarande

Agarytorna ska vara jämna och fuktiga, men inte alltför fuktiga eftersom det kan leda till sammanhängande växtmönster.

Stryk ut provet så snart som möjligt efter att det ankommit till laboratoriet. Plattan med utstryket används primärt för isolering av renkulturer från prover med blandflora. Vid odling direkt från provtagningsspinne rullas istället pinnen över ett litet ytområde nära kanten varefter plattan stryks från det inokulerade området. Inkubera plattorna eller rören under önskade förhållanden. Läs tillämpliga referenser för vidare information om behandling och inkubering av prover.²⁻⁸

Vid användning för påvisande av jästsvamp (t.ex. *Candida*-arter) i kliniska prover, inkubera i 48 timmar vid 30 till 35 °C. Om sporbildande svampar, inklusive dermatofyter, misstänks, inkubera i en vecka eller längre vid 25 till 30 °C. Dermatofyter kan emellanåt kräva 3 veckor eller längre för att tillväxa. Vid användning för hygienkontroll, inkubera i upp till 7 dagar vid 20 till 25 °C. För isolering av dermatofyter ska även **BD Dermatofyte Agar** användas. Se till att tillräcklig fuktighet tillhandahålls om inkuberingen är längre än 3 dagar. Plattor kan förseglas med självhäftande tejp för att undvika uttorkning. För detaljer avseende tillväxttemperatur och inkubering, se referenserna.²⁻⁸

Skivmediet i rör används till odling och underhåll av svampkulturer. Stryk på stammen direkt efter suspendering i sterilt vatten eller fysiologisk koksaltlösning på hela skivans yta. Inkubera som lämpligt för isolatet ifråga. Under inkuberingstiden ska lock lossas något för att tillåta luftväxling. Efter inkubering och vid förvaring ska locken skruvas på tätt.

Resultat

Efter inkubering kan det finnas ett område med sammanhängande växt på plattorna. Eftersom strykningstechniken egentligen är en "spädningsteknik" minskar antalet mikroorganismer som avsättes på de strykta områdena. Följaktligen bör en eller flera av dessa områden visa isolerade kolonier av organismerna som finns i provet. Dessutom kan växt av varje enskild organism räknas semikvantitativt på basen av växt i vart och ett av de strykta områdena.

Skivor som inokulerats med korrekt inokulat visar växt över hela ytan. Inokulerade rör kan förvaras i kylskåp i flera månader utan förlust av odlingens viabilitet. Överlevnadstiden beror på den individuella stammen.

Antal och typ av svampar som växer på det färdigställda mediet berett av **BD Sabouraud Glucose Agar** (Medier på flaska) är mycket stort. Därför kan inga specifika detaljer avseende deras utseende anges här. Se referenserna.^{2,4,8-10}

Från isolaten som fås från plattmediet bör lämpliga sekundärkulturer iordningställas för att tillåta vidare differentiering och identifiering av de isolerade svamparna.

KLINISKA PRESTANDA OCH PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR

BD Sabouraud Glucose Agar (Media på flaska) används i ett antal icke kliniska förfaranden.^{5,6} Inom klinisk mikrobiologi kan plattmediet användas för isolering av svampar från alla typer av kliniska prover.^{2-4,8-10}

Skivmediet i rör används inte direkt med kliniska prover utan används för underhåll av växt av rena svampkulturer.

Mediet utan tillsats är endast svagt selektivt och därför kan bakterier tillväxa, i synnerhet efter längre inkubering. Om bakteriell kontaminering av proverna, materialen eller området som ska undersökas misstänks, ska antibakteriella antimikroba medel tex. gentamicin och kloramfenikol, tetracyklin, bensylpenicillin eller något annat lämpligt sådant medel tillsättas mediet före användning (se **Reagensberedning**).

På grund av den stora variationen vad gäller tillväxttemperatur för svamp, kan det vara nödvändigt att inokulera flera plattor av samma medium och inkubera dem vid olika temperaturer. Se avsnittet **Testförfarande** och tillämpliga referenser.^{2,4,8,10}

REFERENSER

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. Fromtling (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.

FÖRPACKNINGAR/TILLGÄNGLIGHET

BD Sabouraud Glucose Agar (delvis färdigställt medium i flaska)

Kat.nr 257104	cpu 12	250 mL fyllningsvolym; i 300 mL platt flaska
Kat.nr 257153	cpu 25	100 mL fyllningsvolym; i 150 mL sirapsflaska
Kat.nr 257261	cpu 4	400 mL fyllningsvolym; i 500 mL laboratorieflaska

YTTERLIGARE INFORMATION

Kontakta närmaste BD-representant för ytterligare information.



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