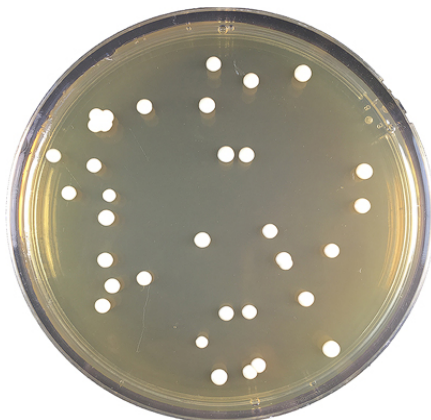




ANVÄNDNINGSSINSTRUKTIONER

SABOURAUD DEXTROSE AGAR

Dehydrerat odlingsmedium

Sabouraud Dextrose Agar: *Candida albicans***1 – AVSEDD ANVÄNDNING**

In vitro-diagnostik. Allmänt medium för isolering och odling av jäst och mögel från kliniska och icke-kliniska prover.

2 – TYPISK SAMMANSÄTTNING *

Pankreatisk nedbrytning av kasein	5 g
Peptisk nedbrytning av kött	5 g
Glukos	40 g
Agar	15 g
Renat vatte	1 000 ml

*Formeln kan justeras och/eller kompletteras för att uppfylla de erforderliga prestandakriterierna.

3 – PRINCIP FÖR METODEN OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

Den italienska advokaten och jordbrukaren Agostino Bassi upptäckte 1835 den mykotiska naturen hos en epidemisk sjukdom hos silkesmaskar som kallas muscardine. Denna upptäckt av sambandet mellan svampar och sjukdomar låg till grund för utvecklingen av medicinsk mykologi.¹ I slutet av 1890-talet hade Raymond Jacques Sabouraud sammanställt och organiserat de spridda observationerna om patogena svampars roll i dermatofytiska infektioner och föreslog ett medium för deras isolering och klassificering.^{1,2}

Weidman och Spring genomförde ett stort antal experiment för att förbättra Sabourauds formel med olika peptoner och kolhydrater³ men det lämpliga mediet valdes ut av Hodges⁴. I sin slutliga formulering innehöll detta medium 1 % pepton, 4 % dextros och 1,8 % agar, med ett slutligt pH-värde på 5,0. Denna formulering fick namnet Sabouraud-medium och är det grundläggande rutinmässiga odlingsmediet som används för att odla svampar i kliniska laboratorier.¹

Sabouraud Dextrose Agar är ett icke-selektivt medium för isolering och odling av jäst och mögel, särskilt dermatofyter, från kliniska prover⁵⁻⁷. Det rekommenderas för total sammanräkning av jäst och mögel och för detektion av *C. albicans* i icke-sterila farmaceutiska produkter enligt den harmoniserade EP-, USP- och JP-metoden⁸.

Pankreatisk nedbrytning av kasein och peptisk nedbrytning av animaliskt vävnad tillhandahåller kväve, kol och spårämnen för mikrobiell tillväxt. Det låga pH-värdet är gynnsamt för svamptillväxt och hämmar något kontaminerande bakterier. Glukos i hög koncentration är en källa till kol och energi.

4 – ANVISNINGAR FÖR BEREDNING AV MEDIUM

Lös upp 65 g i 1 000 ml kallt renat vatten. Värm till kokning under kraftig omrörning och sterilisera genom autoklivering vid 121 °C i 15 minuter. Kyl till 47–50 °C och håll i sterila petriskålar.

Anmärkningar

Överskrid inte kok- och steriliseringsstiderna och -temperaturerna.

Alternativt kan man fördela i skruvlockade rör före sterilisering och låta stelna i lutande läge.

5 – FYSISKA EGENSKAPER

Utseende på dehydratiserat medium

gult, fint, homogent, fritt flytande pulver

Utseende på lösning och beredda plattor

gult, klart

Slutligt pH vid 20–25 °C

5,6 ± 0,2

6 – MATERIAL SOM TILLHANDAHÅLLS

Produkt	Typ	REF	Förpackning
Sabouraud Dextrose Agar	Dehydrerat medium	4020052	500 g (7,7 L)
		4020054	5 kg (77 L)

7 – MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS

Autoklav, vattenbad, sterila ögglor och svabbprover, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, petriskålar, Erlenmeyerkolvar, kompletterande odlingsmedier och reagenser för identifiering av kolonierna.

8 – PROVER

Sabouraud Dextrose Agar kan direkt inokuleras med många kliniska prover som samlats in från olika normalt sterila och icke-sterila platser på människor. Se den citerade litteraturen för provtyper relaterade till specifika infektioner.⁵⁻⁷ Sabouraud Dextrose Agar är inte lämpligt för direkt inokulation av blodprover. Samla in prover före antimikrobiell behandling om möjligt. God laboratoriesed för insamling, transport och förvaring av kliniska prover bör tillämpas. Se lämpliga referenser för ytterligare information.⁵ För farmaceutiska prover, se EP för detaljer om provinsamling och beredning.⁸





9 – TESTFÖRFARANDE

Låt plattorna anta rumstemperatur och låt ytan på mediet torka. Inokulera det kliniska provet så snart som möjligt efter insamling; stryk med en ögla över de fyra kvadranterna på plattan för att få väl isolerade kolonier. Alternativt, om materialet odlas direkt från en bomullspinne, rulla bomullsspinnen över ett litet område på ytan vid kanten; stryk sedan från detta inokulerade område. För hudprover, tryck provet lätt mot mediet.

Inokulera varje prov i två exemplar; inkubera det ena exemplaret under aeroba förhållanden vid 22–25 °C och det andra vid 33–37 °C.¹⁰ För dermatofyter, undersök odlingarna var 4–6 dag under en period på upp till 20 dagar; för andra, inkubera 2–5 dagar. Plattorna bör inkuberas under förhållanden med ökad luftfuktighet under långvarig inkubering.

Användaren ansvarar för att välja lämplig inkubationstid och temperatur beroende på det bearbetade provet, kraven för de organismer som ska återvinnas och lokalt tillämpliga protokoll.

För detektion av *C. albicans* i icke-sterila läkemedelsprodukter bör den teknik som rekommenderas av Europeiska farmakopén⁸ och sammanfattas nedan följas:

- Bered en provsuspension i 100 ml Sabouraud-buljong med 10 ml prov eller en mängd motsvarande minst 1 g eller 1 ml av den produkt som ska undersökas. Blanda och inkubera vid 30–35 °C i 3–5 dagar.
- Odlar vidare på en platta med Sabouraud-dextrosagar och inkubera vid 30–35 °C i 24–48 timmar.

10 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Kliniskt prov: Efter inkubation observeras bakterietillväxten och de specifika morfologiska och kromatiska egenskaperna hos kolonierna registreras och subkulturen överförs till lämpliga medier för ytterligare identifieringstester.

Icke-sterila läkemedel: tillväxt av vita kolonier indikerar möjlig förekomst av *C. albicans*. Detta bekräftas genom identifieringstester. Testet ska betraktas som negativt om sådana kolonier inte förekommer eller om identifieringstesterna är negativa.

11 – ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av produkterna släpps för försäljning efter att kvalitetskontrollen har utförts för att kontrollera att specifikationerna uppfylls. Slut användaren kan dock utföra sin egen kvalitetskontroll i enlighet med lokala tillämpliga bestämmelser, i enlighet med ackrediteringskrav och laboratoriets erfarenhet. Nedan listas några teststammar som är användbara för kvalitetskontroll.⁹

KONTROLLSTAMMAR	INKUBATIONSTEMPERATUR/T/ATM	FÖRVÄNTADE RESULTAT
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	25–35 °C / upp till 72 timmar / Agod tillväxt, vita jästliknande kolonier	
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533	25–35 °C / upp till 72 timmar / Agod tillväxt, vita kolonier med typisk morfologi	

A: aerob inkubation; ATCC är ett varumärke som står för American Type Culture Collection

12 – PRESTANDAEGENSKAPER

Innan produkten släpps ut på marknaden testas ett representativt prov från alla partier av dehydrerad Sabouraud Dextrose Agar (Test Batch-TB) med avseende på produktivitet och selektivitet genom att resultaten jämförs med ett tidigare godkänt referensparti (RB).

Produktiviteten testas genom ett kvantitativt test med målstammarna *C. albicans* ATCC 10231, *A. brasiliensis* ATCC 16404, *S. cerevisiae* ATCC 9763. Sabouraud Dextrose Agar-plattor inokuleras med decimala utspädningar i saltlösning av koloniernas suspensioner och inkuberas vid 30–35 °C och 20–25 °C i 24 och 72 timmar. Kolonierna räknas på båda satserna och produktivetsförhållandet ($Pr = CFU_{TB}/CFU_{RB}$) beräknas. Om Pr är $\geq 0,7$ och koloniernas morfologi är typisk, anses resultaten vara godtagbara och överensstämmer med specifikationerna.

Dessutom testas produktivetskaraktistika med semikvantitativ ekometrisk teknik med följande stammar: *P. chrysogenum* ATCC 10106, *T. mentagrophytes* ATCC 9533, *M. canis* ATCC 36299. Efter inkubation vid 20–25 °C i upp till 72 timmar utvärderas och registreras tillväxten på plattorna och koloniernas egenskaper: de ska vara jämförbara i båda satserna.

Selektiviteten utvärderas med modifierad Miles-Misra-ytdroppmetod genom att inokulera plattorna med decimala utspädningar i saltlösning från 10^{-1} till 10^{-6} av en 0,5 McFarland-suspension av de icke-målinriktade stammarna *E. coli* ATCC 25922 och *S. aureus* ATCC 25923. Tillväxten av icke-målstammen hämmas delvis i båda satserna.

13 – METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Sabouraud Dextrose Agar har dåliga selektiva egenskaper; ett selektivt medium bör inokuleras parallellt för isolering av svampar från potentiellt kontaminerade prover.
- Även om de mikrobiella kolonierna på plattorna kan särskiljas på grundval av sina morfologiska och kromatiska egenskaper, rekommenderas att biokemiska, immunologiska, molekylära eller masspektrometriska tester utförs på isolat från renkultur för fullständig identifiering. Om det är relevant, utför test av antimikrobiell känslighet.
- Detta odlingsmedium är avsett som ett hjälpmedel vid diagnos av infektionssjukdomar. Tolkningsen av resultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten från andra diagnostiska tester.

14 – FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

- Det här är en produkt för kvalitativ *in vitro*-diagnostik, endast avsedd för professionellt bruk. Den ska användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal som iakttar godkända försiktighetsåtgärder mot biologiska risker och aseptiska tekniker.
- Uttorkade medier måste hanteras med lämpligt skydd. Konsultera säkerhetsdatabladet före användning.
- Detta odlingsmedium innehåller råmaterial av animaliskt ursprung. Kontroller av djuren före och efter slakt samt under produktions- och distributionscykeln för råvarorna kan inte helt garantera att denna produkt inte innehåller några överförbara patogener. Det rekommenderas därför att kulturmediet behandlas som potentiellt smittsamt och hanteras med iakttagande av de vanliga särskilda försiktighetsåtgärderna: förtär inte, andas inte in och undvik kontakt med hud, ögon eller slemhinnor. Ladda ner TSE Statement från webbplatsen www.biolifeitaliana.it, som beskriver de åtgärder som Biolife Italiana har vidtagit för att minska riskerna i samband med smittsamma djursjukdomar.
- Tillämpa god tillverkningsssed vid beredningen av odlingsmedier på plattor, i rör eller flaskor.
- Alla laboratorieprover ska betraktas som smittsamma.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar som odlingsmedium eller mikrobiella agens.
- Sterilisera allt biologiskt riskavfall innan det kasseras. Kassera det oanvända mediet och de steriliserade plattorna som inokulerats med prover eller mikrobiella stammar i enlighet med gällande lokal lagstiftning.





- Använd inte odlingsmediet som aktiv ingrediens i farmaceutiska preparat eller som produktionsmaterial avsett för konsumtion av människor och djur.
- Analyscertifikaten och säkerhetsdatabladet för produkten finns tillgängliga på webbplatsen www.biolifeitaliana.it.
- Meddela Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) och berörda myndigheter om allvarliga incidenter som inträffar i samband med användningen av *in vitro*-diagnostiken.
- Informationen i detta dokument har definierats efter bästa kunskap och förmåga och utgör en riktlinje för korrekt användning av produkten men utan förpliktelse eller ansvar. I alla fall måste gällande lokala lagar, förordningar och standardförfaranden följas vid undersökning av prover som tagits från mänskliga och djuriska organ, miljöprover och produkter avsedda för konsumtion av människor eller djur. Vår information befriar inte våra kunder från deras ansvar att kontrollera att våra produkter är lämpliga för det avsedda ändamålet.

15 – FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET

Förvaras vid +10 °C / +30 °C på en torr plats, skyddad från direkt ljus. Vid korrekt förvaring kan produkten användas fram till utgångsdatum. Använd inte produkten efter detta datum. Undvik att öppna flaskan på fuktiga platser. Efter användning måste behållaren stängas ordentligt. Kasserar produkten om behållaren och/eller locket är skadade, eller om behållaren inte är väl tillsluten, eller vid uppenbar försämring av pulvret (färgförändringar, hårdning, stora klumpar). Användaren ansvarar för tillverknings- och kvalitetskontrollprocesserna för beredda medier och för valideringen av giltighetstiden för de färdiga produkterna, beroende på typ (plattor/rör/flaskor) och tillämpad förvaringsmetod (temperatur och förpackning).

16 – REFERENSER

1. Espinel-Ingroff A. History of medical mycology in the United States. Clin Microbiol Rev 1966;9:235-272
2. Sabouraud R. Contribution a l'etude de la trichophytie humaine. Etude clinique, microscopique et bacteriologique sur la pluralite des trichophytens de l'homme. Ann Dermatol Syphil 1892; 3:1061-1087.
3. Weidman FD, Spring D. Comparison of ringworm culture ingredients: II and III. Arch Dermatol Syphilol 1928; 18:829-851.
4. Hodges RS. Cultures of ringworm fungi on Sabouraud's proof mediums and on mediums prepared with American peptones and sugars. Arch Dermatol Syphilol 1928;18:852-856.
5. McGowan K. Specimen Collection, Transport and Processing: Mycology. In Jorgensen JH, Pfaller et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; Vol. 2 2015.
6. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. 2003; Geneva: World Health Organization.
7. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
8. European Pharmacopoeia, current edition
9. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
10. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.

TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

REF eller REF Katalognummer	LOT Batch-kod	IVD Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik	 Tillverkare	 Använd senast
 Temperaturbegränsning	 Innehållet räcker till <n> tester	 Se bruksanvisningen	 Förvara skyddat från direkt ljus	 Förvaras torrt

REVIDERINGSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringarna	Datum
Revidering 1	Uppdaterad layout och innehåll	2020/05
Revidering 2	Ändringar i "försiktighetsåtgärder och varningar" och "förvaringsförhållanden och hållbarhet".	2022/01
Revidering 3	Borttagning av föråldrad klassificering	2023/04

Anmärkning: mindre typografiska, grammatiska och formateringsändringar inkluderas inte i granskningshistoriken.

