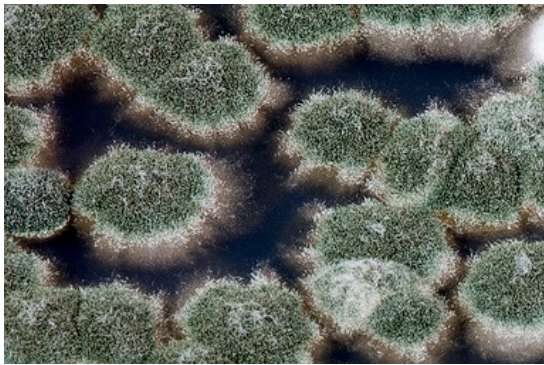


**ISTRUZIONI PER L'USO****SABOURAUD DEXTROSE AGAR + CAF****Piastre pronte all'uso**

Aspergillus restrictus
su Sabouraud Dextrose Agar + CAF

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo per l'isolamento ed il conteggio di lieviti e muffe, in campioni clinici e non clinici.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Digerito pancreatico di caseina	5,00 g
Digerito peptico di carne	5,00 g
Glucosio	40,00 g
Agar	15,00 g
Cloramfenicolo	0,05 g
Acqua purificata	1000 mL

*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Alla fine del 1890, Raymond Jacques Sabouraud riassunse e organizzò le numerose osservazioni sul ruolo dei funghi patogeni nelle infezioni dermatofitiche e propose un terreno di coltura per il loro isolamento e la classificazione.^{1,2} Numerosi esperimenti furono condotti da Weidman e Spring³ per migliorare la formula del terreno sviluppato da R.J. Sabouraud, con una varietà di peptoni e carboidrati, ma il terreno più appropriato fu descritto da Hodges nel 1928⁴. Nella sua formulazione finale, questo terreno conteneva un peptone all'1%, glucosio al 4% ed agar all'1,8%, con un pH finale di 5,0. Questa formulazione fu denominata Sabouraud medium ed è, ancora oggi, con qualche modifica, il terreno di coltura di routine di base utilizzato per coltivare i funghi nei laboratori clinici.

I componenti del terreno base (Sabouraud Dextrose Agar) sono conformi alle indicazioni della Farmacopea europea⁵. L'aggiunta di cloramfenicolo è una modifica studiata per aumentare l'inibizione batterica e migliorare l'isolamento dei funghi opportunisti da campioni contaminati.

Sabouraud Dextrose Agar + CAF è un terreno selettivo per l'isolamento di lieviti e muffe da campioni clinici, soprattutto patogeni opportunisti (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, ecc), funghi sensibili alla cicloeximide quali *Cryptococcus neoformans* ed *Allescheria boydii* e *Candida* spp. e per il conteggio di lieviti e muffe in campioni non clinici quali i cosmetici, come raccomandato dalla norma ISO 16212.⁶

Il peptone di caseina ed il peptone di carne forniscono azoto sotto forma di peptidi e di aminoacidi necessari alla crescita microbica, il glucosio, ad alte concentrazioni, è una fonte di carbonio e di energia. La selettività del terreno è dovuta al suo pH acido (5,6) ed alla presenza del cloramfenicolo, un antibiotico ad ampio spettro, attivo contro numerosi batteri Gram positivi e Gram negativi.

4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in piastra terreno limpido di colore giallo
pH finale a 25 °C 5,6 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Sabouraud Dextrose Agar + CAF CND: W0104030201- EDMA: 14.03.02.01, RDM: 1446312/R	Piastre pronte all'uso	542006	2 x 10 piastre ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione dei microrganismi.

7 - CAMPIONI

Le piastre di Sabouraud Dextrose Agar + CAF (SDA-CAF) possono essere inoculate direttamente con una varietà di campioni clinici umani raccolti da siti non sterili. Consultare la bibliografia citata per i campioni da esaminare in rapporto a specifiche infezioni.^{7,8} Le piastre di SDA CAF non sono indicate per la semina diretta di campioni di sangue e di altri campioni raccolti da siti normalmente sterili. Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici.⁷ Per i campioni cosmetici, consultare la norma ISO 16212 per i dettagli sulla raccolta e la preparazione dei campioni.⁶

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno.

Campioni clinici

Inoculare con il materiale appena possibile dopo la sua raccolta. Strisciare il campione con l'ansa su quattro quadranti della piastra, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate. In alternativa se il campione è seminato direttamente dal tampone di raccolta, rotolarlo su un'area ristretta in prossimità del bordo piastra quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa. Per i campioni cutanei, premere leggermente il campione sulla superficie del terreno.





Inoculare ciascun campione in duplicato; incubare un set in condizioni aerobiche a 20-25°C, ed il secondo a 33-37°C.⁹
Per i dermatofiti, esaminare le colture ogni 4-6 giorni per un periodo fino a 20 giorni; per altri funghi incubare 2-5 giorni. Durante le incubazioni prolungate, le piastre devono essere incubate in condizioni di maggiore umidità.
L'utilizzatore è responsabile della scelta del tempo di incubazione, della temperatura e dell'atmosfera appropriata, a seconda del campione in esame, delle esigenze nutrizionali degli organismi da isolare e dei protocolli operativi locali applicabili.

Campioni cosmetici

Per l'enumerazione di lieviti e muffe nei cosmetici, seguire le indicazioni dalla norma ISO 16212⁶, sintetizzata di seguito per il metodo della semina in superficie.
Distribuire sulla superficie del terreno in piastra un volume non inferiore a 0,1 mL della sospensione iniziale e/o della diluizione del campione.
Incubare a 25°C ± 2,5°C per 3-5 giorni.
La norma ISO descrive anche i metodi per filtrazione su membrana e per inclusione.

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Campione clinico: dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie e trapiantare su terreni appropriati per ulteriori test di identificazione.
Prodotti cosmetici: dopo l'incubazione, contare le colonie nelle piastre di Petri contenenti da 15 a 150 colonie.

10 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità¹⁰

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	20-25°C / ≤ 5 giorni / A	buona crescita, colonie bianche lieviformi
<i>T.mentagrophytes</i> ATCC 9533	20-25°C / ≤ 5 giorni / A	buona crescita, colonie bianche con morfologia tipica
<i>A.brasiliensis</i> ATCC 16404	20-25°C / ≤ 5 giorni / A	buona crescita, colonie con ife nere e morfologia tipica
<i>E.coli</i> ATCC 25922	20-25°C / ≤ 5 giorni / A	inibito

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre pronte all'uso di Sabouraud Dextrose Agar + CAF e della materia prima impiegata per la produzione, terreno in polvere Sabouraud Dextrose Agar w/CAF 50 mg, (TB) vengono testati per la produttività e la selettività avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento (RB).
La produttività è saggiata con metodo quantitativo con i seguenti ceppi target: *C.albicans* ATCC 10231, *A.brasiliensis* ATCC 16404, *S.cerevisiae* ATCC 9763. Le piastre di SDA-CAF sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina di sospensioni di colonie dei ceppi target. Dopo incubazione a 20-25°C per 3-5 giorni in aerobiosi vengono contate le colonie sviluppate sul lotto in esame e sul lotto di riferimento e calcolato l'indice di produttività ($Pr = \frac{UFC_{TB}}{UFC_{RB}}$). Nel caso *Pr* sia maggiore o uguale a 0,7 e nel caso la morfologia delle colonie sia tipica i risultati sono giudicati conformi.

Inoltre la produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi target: *P.chrysogenum* ATCC 10106, *T.mentagrophytes* ATCC 9533. Dopo incubazione a 20-25 °C fino a 5 giorni, viene valutata e registrata l'entità delle crescite e le caratteristiche delle colonie: esse devono essere comparabili in entrambi i lotti.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni da 10⁻¹ a 10⁻⁴ di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 dei ceppi non target *E.coli* ATCC 25922, *P.mirabilis* ATCC 10005 e *S.aureus* ATCC 25923. La crescita di *E.coli* e *S.aureus* è totalmente inibita, la crescita di *P.mirabilis* risulta parzialmente in entrambi i lotti.

12 - LIMITI DEL METODO

- Il cloramfenicolo può risultare inibitorio per i funghi patogeni.
- Sabouraud Dextrose Agar + CAF ha una scarsa efficacia nell'isolamento di *Histoplasma capsulatum* da campioni clinici potenzialmente contaminati.¹¹
- Un singolo terreno di coltura è raramente sufficiente per recuperare tutti i patogeni contenuti in un campione. Pertanto, è necessario utilizzare terreni aggiuntivi per l'isolamento di lieviti e muffe con selettività inferiore come Sabouraud Dextrose Agar o Potato Dextrose Agar e con selettività più elevata come Mycobios Selective Agar e/o Dermathophyte Test Medium.
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche e morfologiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni d'uso specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.





- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.










14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

15 - BIBLIOGRAFIA

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 trichophytons de l'homme. Ann Dermatol Syphilol 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. European Pharmacopoeia, current edition.
6. ISO16212:2017. Cosmetics -Microbiology -Enumeration of yeast and mould.
7. 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.
8. Public Health England- UK SMI B 17: tissues and biopsies from deep-seated sites and organs. 05.01.18
9. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
10. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
11. Unis G, da Silva VB, Severo LC. Disseminated histoplasmosis and AIDS. The role of culture medium for the bronchoscopic clinical specimens Rev Soc Bras Med Trop. 2004;37:234-7.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Non riutilizzare	 Fragile maneggiare con cura

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	08/2020

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

