

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

Trychophyton mentagrophytes
Su Sabouraud Dextrose Agar+ CAF+Cycloheximide

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo per l'isolamento di funghi patogeni, specialmente dermatofiti, da campioni 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
Cicloesimide	0,50 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} 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 e di cicloesimide è una modifica studiata per aumentare le proprietà selettive e per migliorare l'isolamento di funghi patogeni, in particolare dermatofiti, da campioni contaminati da batteri e funghi saprofiti.

In seguito alle osservazioni iniziali di Whiffen *et al.*⁴, la cicloesimide si è rivelata utile per aumentare il numero di isolamenti di funghi patogeni da materiali clinici.⁵

Sabouraud Dextrose Agar+CAF+Cycloheximide (SDA CAF-CEX) è particolarmente utile per lo studio di campioni dermatologici nell'ambito della diagnostica delle micosi superficiali e gli organismi target sono i dermatofiti ed alcuni lieviti.⁶

Il peptone di caseina ed il peptone di carne forniscono carbonio, oligoelementi ed 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 di cloramfenicolo, un antibiotico ad ampio spettro, attivo contro numerosi batteri Gram positivi e Gram negativi e di cicloesimide, un antimicrobico che inibisce i funghi saprofiti a crescita più rapida.⁷

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+Cycloheximide CND: W0104030201- EDMA: 14.03.02.01, RDM: 1446313/R	Piastre pronte all'uso	542008	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

Sabouraud Dextrose Agar+CAF+Cycloheximide può essere inoculato direttamente con campioni clinici raccolti da siti contaminati da funghi e batteri saprofiti, principalmente pelle, unghie, capelli. Considerare che la cicloesimide può inibire alcuni funghi opportunisti (vedere Limitazioni del metodo). Consultare la bibliografia citata per i campioni da esaminare in rapporto a specifiche infezioni.^{6,8}

Sabouraud Dextrose Agar + CAF + Cycloheximide non è adatto per l'inoculo diretto di campioni provenienti 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.^{6,8}

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.

L'utilizzatore è responsabile della scelta del tempo e della temperatura di incubazione, a seconda del campione in esame, delle esigenze nutrizionali degli organismi da isolare e dei protocolli operativi locali applicabili.

Per l'isolamento dei dermatofiti incubare a 26-30°C ed esaminare le colture ogni 4-6 giorni per un periodo massimo di 21 giorni.⁶

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie e trapiantare su terreni appropriati per ulteriori test di identificazione.

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>T.mentagrophytes</i> ATCC 9533	26-28°C / 72 H/ A	buona crescita, colonie bianche con morfologia tipica
<i>S.cerevisiae</i> ATCC 9763	26-28°C / 72 H/ A	inibito
<i>E.coli</i> ATCC 25922	26-28°C / 72 H/ 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+Cycloheximide vengono testati per la produttività e la selettività.

La produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi target: *T.mentagrophytes* ATCC 9533 e *C.albicans* ATCC 10231. Dopo incubazione a 26-28°C per 72 ore, viene valutata e registrata l'entità delle crescite e le caratteristiche delle colonie. I ceppi target mostrano una buona crescita con colonie bianche e morfologia tipica.

La selettività viene valutata con metodo Miles-Misra modificato inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione McFarland 0,5 dei ceppi non-target *E.coli* ATCC 25922, *A.brasiliensis* ATCC 16404 e *S.cerevisiae* ATCC 9763. La crescita dei ceppi non-target è totalmente inibita.

12 - LIMITI DEL METODO

- La cicloesimide può inibire alcuni importanti funghi opportunisti come *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Pseudallescheria*, *Trichosporon*, alcune specie di *Aspergillus*, *Talaromyces* (ex *Penicillium*) *marneffe*, funghi mucoracei, alcuni funghi dematiacei e lieviti come *Cryptococcus* spp. e alcune specie di *Candida*.⁷
- Alcune rare muffe non dermatofitiche (*N.dimidiatum*, *N.hyalinum*, *Hortaea werneckii*) sono in grado di causare lesioni simili ai dermatofiti ma sono inibite dalla cicloesimide. Se si sospetta la possibilità di infezione con queste muffe, il campione deve essere seminato su un terreno privo di cicloesimide.⁶
- Il cloramfenicolo può inibire alcuni funghi patogeni.¹⁰
- Un singolo terreno è solo raramente sufficiente per recuperare tutti i patogeni contenuti in un campione, pertanto è necessario impiegare terreni sia con che senza agenti inibitori per la semina primaria del campione.
- 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 trichophytos 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	o REF	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
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	01/2021

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

