

**ISTRUZIONI PER L'USO****RPMI AGAR**
Piastre pronte all'usoRPMI Agar: *Candida krusei* e strisce a gradiente di voriconazolo**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno di coltura per la determinazione quantitativa della sensibilità agli agenti antifungini mediante strisce a gradiente.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

| | |
|------------------|---------|
| RPMI 1640 | 10,4 g |
| MOPS** | 34,5 g |
| Glucosio | 20,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Acqua purificata | 1000 mL |

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

** acido 3-(N-morfolino) propanulfonico

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo di riferimento per i test di sensibilità antifungina è la micro-diluzione in brodo, descritto nei documenti pubblicati dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹ e da European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST)^{2,3,4}. Questi metodi di riferimento richiedono molto tempo e sono scarsamente adatti al contesto clinico della routine di laboratorio.⁵ Per superare questi limiti sono stati sviluppati e resi disponibili per il laboratorio metodi alternativi, basati su strisce con gradiente di agente antifungino. Tali test si basano sul trasferimento e sulla diffusione di un gradiente a concentrazione stabile di un agente antimicrobico da una striscia di plastica o di carta su terreno solido in piastra. Il terreno indicato per la determinazione della CMI con strisce a gradiente è RPMI 1640 addizionato di agar, glucosio e tamponato con MOPS. Questo terreno deriva dalla formulazione raccomandata per il test di micro-diluzione in terreno liquido. RPMI 1640 è stato sviluppato da Moore, Gerner e Franklin⁶ nel 1967 presso il Roswell Park Memorial Institute, dal quale deriva il suo nome. Contiene vitamine, aminoacidi, sali, un indicatore di pH ed è ampiamente utilizzato per le colture cellulari. Quando addizionato di MOPS, glucosio ed agar, RPMI 1640 ha dimostrato di fornire CMI accurate con agenti antifungini su strisce a gradiente, paragonabili ai risultati ottenuti con il metodo di riferimento CLSI.^{4, 7-11}

4 - CARATTERISTICHE FISICHE

| | |
|----------------------|---------------|
| Aspetto | rosa, limpido |
| pH finale a 20-25 °C | 7,0 ± 0,2 |

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

| Prodotto | Tipo | REF | Confezione |
|--|------------------------|----------|---|
| RPMI Agar CND: W0104010403 EDMA: 14.01.04.0; RDM: 1446011/R | Piastre pronte all'uso | 54RPMI90 | 2 x 10 piastre ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone |
| RPMI Agar CND: W0104010403 EDMA: 14.01.04.0; RDM: 1446019/R | Piastre pronte all'uso | 54RPMI15 | 5 piastre ø 150 mm confezionamento primario: sacchetto di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone |

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, strisce a gradiente con antifungini.

7 - CAMPIONI

Il test di sensibilità con strisce a gradiente è effettuato su colture pure dei ceppi fungini in esame, isolati da campioni clinici. RPMI Agar non è adatto all'isolamento microbico direttamente da campioni clinici.

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre e le strisce a gradiente a temperatura ambiente. La superficie dell'agar deve essere asciutta prima dell'uso.

Linee guida per la preparazione degli inoculi:

Lieviti: sospensione in soluzione salina con torbidità pari a McFarland 0,5 per *Candida* spp. e McFarland 1 per *C.neoformans*.

Muffe: sospensione di conidi e hyphae (crescita matura di 5-7 giorni) in soluzione salina con Tween, con torbidità pari a McFarland 0,5 per *Aspergillus* spp. e McFarland 1 per *Fusarium* e *Rhizopus* spp.

Immergere un tampone di cotone sterile nella sospensione e rimuovere il liquido in eccesso premendo e ruotando il tampone contro l'interno della provetta. Con il tampone di cotone inoculare in maniera omogenea tutta la superficie della piastra avendo cura di verificare che non vi siano zone della piastra prive di inoculo. Immergere di nuovo il tampone e strisciare una seconda volta.

Non appena l'inoculo è stato assorbito e la superficie dell'agar è asciutta, applicare le strisce a gradiente. Assicurarsi che le strisce siano a completo contatto con la superficie dell'agar e non devono essere spostate una volta applicate poiché la diffusione iniziale degli agenti antimicrobici dalle strisce è molto rapida. Le strisce devono essere collocate sulla piastra in modo da non creare zone di inibizione sovrapposte.

Linee guida per l'incubazione:

Lieviti: 35°C in aerobiosi per 24-48 ore per *Candida* spp. e 48-72 ore per *C.neoformans*.





Aspergillus spp.: 35°C/18-24 ore; *Fusarium* spp.: 35°C/24-48 ore, seguita dalla temperatura ambiente per 24-48 ore; *Rhizopus* spp.: 35°C/18-24 ore. Per altre specie, prolungare il tempo di incubazione secondo necessità ed ispezionare quotidianamente le piastre per la formazione di un'ellisse di inibizione leggibile

Per i dettagli sulle procedure di inoculo ed incubazione, consultare le IFU del produttore delle strisce a gradiente.

9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, leggere le piastre dalla parte anteriore con il coperchio rimosso e con luce riflessa.

Un inoculo corretto e piastre seminate in modo soddisfacente dovrebbero dare come risultato un tappeto di crescita confluyente. Se sono visibili singole colonie, l'inoculo è troppo leggero e il test deve essere ripetuto.

La crescita deve essere distribuita uniformemente sulla superficie dell'agar per ottenere un'ellisse di inibizione uniforme.

Leggere la CMI del ceppo di controllo e dei ceppi in esame dove l'ellisse di inibizione interseca la scala numerica della striscia.

Verificare che i risultati per il ceppo di controllo rientrino negli intervalli di accettabilità.

Per specifiche istruzioni di lettura ed interpretazione dei risultati consultare le istruzioni per l'uso del produttore delle strisce.

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 istruzioni fornite dal produttore delle strisce a gradiente, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. A titolo esemplificativo, qui di seguito sono riportati ceppo e strisce a gradiente, utili per il controllo di qualità.

C. parapsilosis ATCC 22019 / anfotericina B, voriconazolo.

Per i dettagli sulla scelta degli antifungini, dei ceppi di controllo e degli intervalli di accettabilità consultare le istruzioni per l'uso del produttore delle strisce.

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 di RPMI Agar sono testati mediante il test di sensibilità antimicrobica. L'AST viene eseguita secondo le IFU del produttore delle strisce a gradiente con i seguenti ceppi e strisce con antifungini:

C. krusei ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC 90028 / anfotericina B e voriconazolo.

Dopo l'incubazione a 35-37°C in aerobiosi per 48 ore, la CMI viene letta nel punto in cui l'ellisse di inibizione interseca la scala a gradiente; le misure vengono registrate e valutate in riferimento agli intervalli di accettabilità riportati sulle istruzioni per l'uso del produttore delle strisce.

12 - LIMITI DEL METODO

- Una concentrazione errata dell'inoculo, la conservazione impropria dei dischi con antimicrobici, la conservazione impropria delle piastre con conseguente modifica dello strato del terreno e del pH, l'umidità eccessiva delle piastre, misurazioni scorrette delle zone di inibizione, sono tutti elementi che possono produrre risultati errati.
- I metodi di semina, incubazione e lettura qui descritti devono essere considerati come linee guida; per garantire risultati affidabili è richiesta la stretta aderenza al protocollo suggerito dal produttore delle strisce a gradiente.
- La lettura e l'interpretazione dei risultati richiedono esperienza e l'attenta osservanza delle istruzioni del produttore delle strisce; possono sorgere problemi quando lettori inesperti interpretano erroneamente come resistenza la debole crescita di fondo di piccole colonie all'interno delle ellissi di inibizione.¹²
- La concordanza di risultati tra il test con strisce a gradiente ed il metodo di riferimento può essere dipendente dalla specie fungina, dal farmaco e dal terreno.^{13,14}
- Il terreno in piastra qui descritto è da intendersi come un ausilio alle scelte terapeutiche per le infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati del test di sensibilità agli antimicrobici 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.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- 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 le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- 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. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 2008.
2. Arendrup MC *et al.* EUCAST definitive document E.7.3.2 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. Valid from 22 April, 2020.
3. Guinea J *et al.* How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates. Clin Microbiol Infect 2019; 25(6):681-687.
4. Arendrup MC *et al.* How to: perform antifungal susceptibility testing of microconidia-forming dermatophytes following the new reference EUCAST method E.Def 11.0, exemplified by *Trichophyton*. Clin Microbiol Infect 2021;27(1):55-60.
5. Ranque SL, Lachaud LM, Gari-oussaint L, Michel-Nguyen A, Mallié M, Gaudart J, Bertout S. Interlaboratory Reproducibility of Etest Amphotericin B and Caspofungin Yeast Susceptibility Testing and Comparison with the CLSI Method. J Clin Microbiol 2012; 50(7): 2305–2309. .
6. Moore GE, Gerner RE, Franklin HA. Culture of normal human leukocytes. JAMA 1967; 199 (8): 519–524
7. Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmström A, Jones RN. Evaluation of Etest method for determining caspofungin (MK-0991) susceptibilities of 726 clinical isolates of *Candida* species. J Clin Microbiol 2001;39 (12):4387-9.
8. Espinel-Ingroff A. . Etest for antifungal susceptibility testing of yeasts. Diagn Microbiol Infect Dis 1994;19(4):217-20
9. Pfaller MA, Messer SA, Houston A, Mills K, Bolmström A, Jones RN. Evaluation of the Etest method for determining voriconazole susceptibilities of 312 clinical isolates of *Candida* species by using three different agar media. J Clin Microbiol . 2000;38(10):3715-7.
10. Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Evaluation of Etest Method for Determining Voriconazole and Amphotericin B MICs for 162 Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol. 2003; 41(1): 97–99.
11. Jong Hee Shin JH *et al.* Detection of amphotericin B resistance in *Candida haemulonii* and closely related species by use of the Etest, Vitek-2 yeast susceptibility system, and CLSI and EUCAST broth microdilution methods. J Clin Microbiol 2012;50(6):1852-5.
12. Johnson EM, Cavling-Arendrup M. Susceptibility Test Methods: Yeasts and Filamentous Fungi. In: Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
13. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Updike CL, Clary CJ. Anidulafungin and micafungin MIC breakpoints are superior to that of caspofungin for identifying FKS mutant *Candida glabrata* strains and echinocandin resistance. Antimicrob Agents Chemoter 57:6361-6365
14. Axner-Elings M, Botero-Kleiven S, Jensen RH, Arendrup MC. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* isolates collected during 1-year period in Sweden. J Clin Microbiol 2011; 49:2516-2521.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

| | | | | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---|-----------------------------|------------------|
| REF Numero di catalogo | o 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 |
|--|---|---------|
| Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 7 | 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.

