

**ISTRUZIONI PER L'USO****CANDIDA AGAR (NICKERSON)**

Terreno di coltura in polvere

Candida Agar (Nickerson) : *Candida albicans***1 - DESTINAZIONE D'USO**

Diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo per l'isolamento e la differenziazione di *Candida* spp. da campioni clinici.

2 - COMPOSIZIONE**FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)***

Estratto di lievito	1 g
Bismuto ammonio citrato	5 g
Sodio solfito	3 g
Glucosio	10 g
Glicina	10 g
Agar	15 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Candida Agar (Nickerson), noto anche come BiGGY (Bismuth Glucose Glycine Yeast) Agar è preparato sulla base della formulazione descritta nel 1953 da Nickerson.¹ Esso è utilizzato per l'isolamento e la differenziazione presuntiva delle specie del genere *Candida* sulla base della morfologia e del colore delle colonie, da campioni clinici.²⁻⁴

Il complesso bismutil-idrossi-solfito, prodotto nel terreno di coltura dal calore, viene ridotto extracellularmente da *Candida* spp. a solfuro in un ambiente neutro o acido e questa riduzione, a seconda dell'intensità, provoca una pigmentazione da marrone a nera delle colonie di lievito.¹

Il solfito di bismuto, il bismuto ammonio citrato e la glicina ad alte concentrazioni, agiscono da composti selettivi ed il terreno non risulta favorevole allo sviluppo di schizomiceti; l'estratto di lievito ed il glucosio stimolano la crescita di *Candida* spp.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 44 g in 1000 ml di acqua purificata fredda e mescolare accuratamente. Riscaldare agitando frequentemente fino all'ebollizione e bollire per 30-60 secondi per sciogliere l'agar e ottenere una sospensione uniforme. Raffreddare a circa 50°C, mescolare delicatamente per disperdere uniformemente il precipitato e versare in piastre di Petri sterili

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, bianca
Aspetto della soluzione ed in piastra	terreno bianco, con precipitato a fiocchi
pH finale a 25 °C	6,8 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Candida Agar (Nickerson)	Terreno in polvere	4012802	500 g (11,4 L)

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

Le piastre di Candida Agar (Nickerson) possono essere inoculate direttamente con una varietà di campioni clinici da siti non sterili quali la bocca, il faringe, l'apparato genitale. 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.⁵

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

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

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.

Incubare in condizioni aerobiche a 28-30°C per un massimo di 5 giorni ed esaminare quotidianamente per la riduzione del solfito.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie. lo sviluppo di colonie da marrone a nere permette una diagnosi presuntiva di genere. Tale diagnosi va naturalmente confermata almeno con un esame microscopico (preparato a fresco, chiarificato con lattofenolo blu metile: pseudomicelio ramificato, cellule di lievito in





gemmazione, presenza di clamidospore, assenza di ascospore). L'identificazione presuntiva di specie può essere fatta tenendo in considerazione le caratteristiche delle colonie delle principali specie di *Candida*, riassunte qui di seguito.²

C. albicans: colonie di colore marrone-nero, lisce, circolari, o semisferiche, con una leggera sfrangiatura miceliare: il colore non diffonde nel terreno.

C. tropicalis: colonie lisce di colore marrone scuro, con centro nero, con una leggera sfrangiatura miceliare, circondate da un alone marrone-nero dopo 72 ore dovuto alla diffusione del colore nel terreno; lucentezza metallica.

C. krusei: colonie larghe rugose argentee, di colore marrone-nero, marroni sui bordi; alone di diffusione giallo nel terreno.

C. pseudotropicalis: colonie luccicanti di media grandezza, piatte, bruno-rossastre con una leggera sfrangiatura miceliare; il colore non diffonde nel terreno.

Candida stellatoidea: colonie di media grandezza, marrone scuro; sfrangiatura miceliare molto leggera.

11 - 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 facoltà 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 qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T°/ t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. albicans</i> ATCC 60193	30°C / 72 H / A	crescita con colonie marrone-nero
<i>C. tropicalis</i> NCPF 8841	30°C / 72 H / A	crescita con colonie marrone scuro e riflessi metallici
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	30°C / 72 H / A	crescita inibita
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	30°C / 72 H / A	crescita inibita

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

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno in polvere *Candida* Agar (Nickerson) vengono testati per la produttività e la selettività avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento

La produttività è saggiata con metodo ecometrico semiquantitativo con i seguenti ceppi target: *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* NCPF 8841, *C. krusei* ATCC 6258, *C. intermedia* d'isolamento clinico. Dopo incubazione a 30 °C per 72 ore, viene valutata e registrata l'entità delle crescite e le caratteristiche delle colonie: esse devono essere comparabili in entrambi i lotti ed in accordo alle specifiche.

Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificate diluizioni di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 dei ceppi non target *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 *A. brasiliensis* ATCC 9642, *P. chrysogenum* ATCC 10106. *A. brasiliensis* risulta parzialmente inibito mentre la crescita degli altri ceppi non target è totalmente inibita.

13 - LIMITI DEL METODO

- Di norma batteri e funghi simil-lieviti sono inibiti sul terreno. Se dovessero crescere con colonie marroni, essi sono facilmente distinguibili con una osservazione microscopica; dermatofiti e muffe crescono raramente e sono distinguibili per la formazione di miceli aerei.²
- Il terreno in piastra deve essere preparato fresco, appena prima dell'uso.²
- I risultati ottenuti con il terreno in provetta non sono soddisfacenti.¹
- 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.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno 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.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura in piastra, in provetta o in flacone.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- 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.

15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di





grossi grumi). Il terreno in piastra deve essere preparato fresco, appena prima dell'uso. L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione del terreno.

15 - BIBLIOGRAFIA

1. Nickerson, W. J. 1953. Reduction of inorganic substances by yeasts. I. Extracellular reduction of sulfite by species of *Candida*. J. Infect. Dis. 93:43.
2. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
3. Atlas R, Parks LC. Handbook of Microbiological Media. 2nd edition. CRC Press,1997
4. Lindsley M. Reagents Stains and Media: Mycology. In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology,12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
5. Berkow EL, McGowan KL. Specimen Collection, Transport and Processing: Mycology . In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology,12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019

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	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	04/2022
Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

