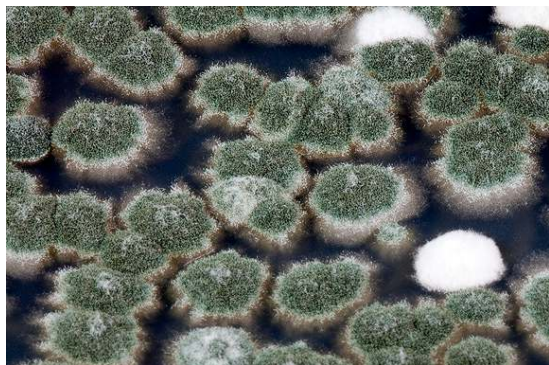


ISTRUZIONI PER L'USO

SABOURAUD DEXTROSE AGAR w/CAF 50 MG

Terreno di coltura in polvere



Aspergillus restrictus
su Sabouraud Dextrose Agar w/CAF 50 mg

1 - DESTINAZIONE D'USO

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 (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)*

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

*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 w/CAF 50 mg 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 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 65 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 47-50°C e trasferire in piastre di Petri sterili.

Note.

Non eccedere nei tempi e nelle temperature di ebollizione e di sterilizzazione.

In alternativa distribuire in provette con tappo a vite prima della sterilizzazione e lasciare solidificare a becco di clarino.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione ed in piastra	terreno limpido di colore giallo
pH finale a 25 °C	5,6 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Sabouraud Dextrose Agar w/CAF 50 mg	Terreno in polvere	4020062	500 g (7,7 L)
		4020064	5 kg (77 L)

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, 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 Sabouraud Dextrose Agar w/CAF 50 mg (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





9 - 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 22-25°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.

10 - 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.

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.¹⁰

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

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di 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 ($Pr = \text{UFC}_{\text{TB}} / \text{UFC}_{\text{RB}}$). Nel caso Pr sia superiore 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 appropriate diluizioni 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.

13 - LIMITI DEL METODO

- Il cloramfenicolo può risultare inibitorio per i funghi patogeni.
- Sabouraud Dextrose Agar w/CAF 50 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 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.

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.





- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime 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 di sicurezza 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura in piastra, in provetta o in fialone.
- 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). L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione del terreno e della validazione del periodo di validità del prodotto finito, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione applicato (temperatura e confezionamento).

16 - 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 trichophyton 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	Proteggere dalla luce	Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	06/2020
Revisione 4	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	01/2022
Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

