

ISTRUZIONI PER L'USO

SABOURAUD DEXTROSE AGAR

Piastre pronte all'uso

 Sabouraud Dextrose Agar: *Candida albicans*
1-DESTINAZIONE D'USO

 Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno d'uso generale per l'isolamento e la coltivazione di lieviti e muffe, da campioni clinici e non clinici.

2-FORMULA TIPICA *

Digerito pancreatico di caseina	5 g
Digerito peptico di carne	5 g
Glucosio	40 g
Agar	15 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

 L'avvocato ed agricoltore italiano Agostino Bassi nel 1835 scoprì la natura micotica di una malattia epidemica dei bachi da seta chiamata muscardina; questo riconoscimento della relazione tra funghi e malattia fu la base per lo sviluppo della micologia medica.¹ 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% e 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.

 Sabouraud Dextrose Agar è utilizzato per l'isolamento e la coltivazione dei funghi patogeni, soprattutto dermatofiti, e saprofiti dai campioni clinici.⁵⁻⁷ Il terreno è indicato per la conta fungina totale e nella procedura di ricerca di *Candida albicans* nei prodotti farmaceutici non sterili con metodi armonizzati EP, USP, JP ed è conforme alle specifiche ivi riportate.⁸

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 moderata selettività del terreno è dovuta al suo pH acido (5,6): la crescita dei contaminanti batterici è parzialmente inibita, fatta eccezione per quelli acidofili.

4-CARATTERISTICHE DEL TERRENO IN PIASTRA

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

5-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Sabouraud Dextrose Agar	Piastre pronte all'uso	542005	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 possono essere inoculate direttamente con una varietà di campioni clinici umani raccolti da siti sterili e non. Consultare la bibliografia citata per i campioni da esaminare in rapporto a specifiche infezioni.⁵⁻⁷ Le piastre di Sabouraud Dextrose Agar non sono indicate per la semina diretta di campioni di sangue. 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 Per i campioni farmaceutici, consultare la Farmacopea Europea per i dettagli sulla raccolta e la preparazione dei campioni.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.

 Inoculare ciascun campione in duplicato; incubare un set in condizioni aerobiche a 22-25°C, ed il secondo a 33-37°C.¹⁰

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 farmaceutici non sterili

Per la determinazione di *C. albicans* nei prodotti farmaceutici non sterili seguire le indicazioni della Farmacopea Europea⁸, qui riassunte.

- Preparare la sospensione del campione in 100 mL di Sabouraud Broth utilizzando almeno 10 g o 10 mL di campione da esaminare. Incubare questa sospensione a 30°C - 35°C per 3-5 giorni.
- Per mezzo di un'ansa trapiantare da Sabouraud Broth su piastra di Sabouraud Dextrose Agar ed incubare 30°C - 35°C per 24-48 ore.

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 farmaceutici non sterili: la crescita di colonie bianche indica la possibile presenza di *C. albicans*, confermata dai test di identificazione. Il test deve essere considerato negativo se tali colonie non sono presenti o se i test di identificazione risultano negativi.

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 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 qualità⁸

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	25-35°C / fino a 72 ore / A	buona crescita, colonie bianche lieviformi
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533	25-35°C / fino a 72 ore / A	buona crescita, colonie bianche con morfologia tipica

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 di Sabouraud Dextrose Agar e della materia prima impiegata per la produzione, terreno in polvere Sabouraud Dextrose Agar REF 402005 (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 Sabouraud Dextrose Agar sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina di sospensioni di colonie dei ceppi target. Dopo incubazione a 30-35°C ed a 20-25°C per 24 e 72 ore in aerobiosi vengono contate le colonie sviluppate sul lotto in esame e sul lotto di riferimento e calcolato l'indice di produttività ($Pr = \frac{UFC_{TB}}{UFC_{RB}}$). Quando 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, *M. canis* ATCC 36299. Dopo incubazione a 20-25 °C fino a 72 ore, 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^{-6} di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 dei ceppi non target *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923. La crescita di tali ceppi è parzialmente inibita in entrambi i lotti.

12-LIMITI DEL METODO

- Sabouraud Dextrose Agar ha scarse proprietà selettive; in parallelo deve essere inoculato un terreno selettivo per l'isolamento di funghi da campioni potenzialmente contaminati.
- 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. 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.
6. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. 2003; Geneva: World Health Organization.
7. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
8. European Pharmacopoeia, current edition
9. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
10. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.

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 5	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	05/2020
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 6	Rimozione della classificazione obsoleta	03/2023

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

