





*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 facoltà 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.<sup>12</sup>
- 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.<sup>13,14</sup>
- 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](http://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	 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
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 8	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

