

**ISTRUZIONI PER L'USO****ChromArt****CHROMOGENIC CANDIDA AGAR**

Piastre pronte all'uso



Chromogenic Candida Agar: coltura mista di *Candida albicans* (colonie verde-blu), *C.tropicalis* (colonie blu-grigio), *C.krusei* (colonie rosa-viola)

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo e cromogeno per l'isolamento di *Candida* spp. da campioni clinici e per la differenziazione del gruppo *Candida albicans/Candida dubliniensis* da *Candida tropicalis* e da altre specie del genere *Candida*.

2-COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Peptoni	10,30 g
Fattori di crescita	11,70 g
Miscela di sali inorganici	4,60 g
Miscela di cromogeni	0,36 g
Cloramfenicolo	0,50 g
Agar	12,00 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

Le infezioni da lieviti richiedono una diagnosi tempestiva per consentire l'inizio precoce di appropriate terapie antifungine. Dagli inizi degli anni '90 sono stati compiuti progressi nei metodi di laboratorio per la diagnosi di *Candida* spp. ed in particolare di *Candida albicans*, che hanno portato ad un'identificazione più rapida ed affidabile.¹⁻³ Uno di questi metodi è stato l'incorporazione di substrati cromogeni direttamente nel terreno d'isolamento. Un principio comune di questi terreni è l'uso di un substrato cromogeno per la β -esosaminidasi, per differenziare il gruppo *C.albicans/ C.dubliniensis* da altri lieviti e un secondo substrato cromogeno (di solito per rilevare la fosfatasi o la β -glucosidasi) per fornire un'ulteriore discriminazione tra le specie.⁴ Il vantaggio principale di tali terreni è la loro capacità di differenziare colture miste di lieviti, poiché specie diverse spesso formano colonie con colori diversi.

Chromogenic Candida Agar è un terreno cromogeno e selettivo di "seconda generazione" per l'isolamento di *Candida* spp. da campioni clinici e la differenziazione del gruppo *C.albicans-C.dubliniensis* da *Candida tropicalis* e altre specie del genere *Candida*.

La selettività del terreno è dovuta alla presenza del cloramfenicolo che inibisce la crescita dei batteri. La differenziazione è ottenuta con la concomitante presenza di due composti cromogeni. L'idrolisi del substrato per la rilevazione dell'enzima β -esosaminidasi di *C.albicans* e *C.dubliniensis* determina il rilascio di un cromoforo insolubile che rimane all'interno delle colonie conferendo loro un tipico colore verde-blu. L'idrolisi del secondo substrato cromogeno determina il rilascio di un cromoforo rosa insolubile che orienta nell'identificazione di altre specie: *Candida tropicalis* scinde entrambi i composti con formazione di colonie grigio-blu mentre altre specie del genere *Candida* idrolizzano solo il secondo composto cromogeno e crescono con colonie con diverse sfumature di rosa.

4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in piastra giallo chiaro, limpido
pH finale a 25 °C 6,0 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Chromogenic Candida Agar CND:W0104030202; EDMA:14.03.02.02; RDM: 1443953/R	Piastre pronte all'uso	548005	2 x 10 piastre Ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura ausiliari e reagenti per la completa identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

Chromogenic Candida Agar è destinato all'esame batteriologico di campioni clinici non sterili come tampone faringeo, vaginale, orale. Raccogliere i campioni prima della terapia antimicrobica, quando possibile. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici.

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

- Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno.
- Inoculare rotolando il tampone di raccolta su una area ristretta in prossimità del bordo piastra, quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate.
- Incubare a 35-37°C in aerobiosi, per 18-24 e 48 ore.

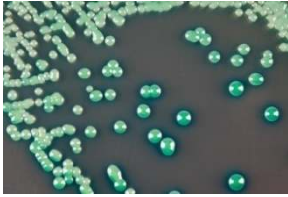
9 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie isolate.

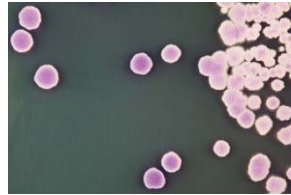




Colonie verde-blu brillante: caratteristiche di *C.albicans* /*C.dubliniensis*. (*C.albicans* qui sotto)



Colonie larghe, piatte, rosa-rosse o violacee, con texture fine e ruvida: caratteristiche di *C.krusei*.



Colonie grigio-blu con riflessi violacei e / o un alone violaceo: caratteristiche di *C.tropicalis*.



Colonie bianche o rosa o rosa-viola: caratteristiche di altre specie di *Candida* (*C.glabrata* qui sotto)



Candida kefir produce colonie rosso-violacee.

I ceppi di *Candida parapsilosis* complex producono colonie rosa, rosa violacee.

I batteri Gram positivi e Gram negativi sono in gran parte inibiti.

10 - CONTROLLO QUALITÀ

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 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 10231	35-37°C / 44-48h / A	buona crescita, colonie verde-blu
<i>C.tropicalis</i>	NCPF 8841	35-37°C / 44-48h / A	buona crescita, colonie grigio-blu
<i>E.coli</i>	ATCC 25922	35-37°C / 44-48 h / A	inibito
<i>S.aureus</i>	ATCC 25923	35-37°C / 44-48 h / A	inibito

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection; NCPF: Public Health England- National Collection of Pathogenic Fungi

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Le caratteristiche di Chromogenic Candida Agar sono state valutate da Andreoni *et al.*⁵ con 82 ceppi di lieviti isolati da campioni umani, identificati con un sistema fenotipico e confermati con metodo spettrometrico e conservati a -80°C e con 80 campioni clinici isolati da campioni respiratori, essudato vaginale, urina ed emocolture positive. Chromogenic Candida Agar è stato confrontato con un terreno cromogeno del mercato. Le conclusioni sono state le seguenti: le osservazioni hanno confermato che il substrato policromogeno Chromogenic Candida Agar può garantire in maniera sostanziale l'identificazione presuntiva di specie di frequente isolamento clinico, consentendo un orientamento identificativo per altre specie di lieviti di minor frequenza di isolamento. La crescita rapida e l'intensità dei colori garantiscono inoltre valutazioni morfologico-tintoriali in tempi più brevi, consentendo un rapido riconoscimento di colture miste. Il confronto tra i due substrati, in generale, ha mostrato una migliore crescita, in termini di dimensione della colonia a 24 e 48 ore, su Chromogenic Candida Agar; anche il colore delle colonie, in termini di tonalità e intensità, è risultato più evidente sulla Chromogenic Candida Agar, consentendo una migliore differenziazione tra specie con colori simili.

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di piastre pronte di Chromogenic Candida Agar e della materia prima utilizzata per la produzione di piastre pronte (terreno in polvere Chromogenic Candida Agar REF 408005) sono testati per la produttività, la specificità e la selettività avendo come riferimento un lotto approvato in precedenza.

Produttività e specificità sono valutate mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi: *C.albicans* ATCC 10231, *C.albicans* ATCC 20912, *C.dubliniensis* NCPF 3949, *C.intermedia* d'isolamento clinico, *C.krusei* ATCC 6258, *C.parapsilosis* ATCC 22019, *C.stellatoidea* ATCC 11006, *C.tropicalis* NCPF 8841, *C.glabrata* d'isolamento clinico. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 e 48 ore, si valutano e registrano l'entità delle crescite e le caratteristiche cromatiche delle colonie. Tutte le specie di *Candida* sviluppano una buona crescita con le seguenti caratteristiche cromatiche (dopo 48 ore d'incubazione):

<i>C. albicans</i>	verde-blu
<i>C. dubliniensis</i>	verde-blu
<i>C. tropicalis</i>	grigio-blu
<i>C. intermedia</i>	rosa pallido
<i>C. krusei</i>	rosa-violetto
<i>C. parapsilosis</i>	rosa pallido
<i>C. stellatoidea</i>	verde-blu
<i>C. glabrata</i>	Leggermente rosate

La selettività viene valutata con metodo Miles-Misra modificato inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione McFarland 0,5 dei ceppi non-target *P.aeruginosa* ATCC 27853 ed *E.faecalis* ATCC 19433. I ceppi non-target risultano totalmente inibiti.



**12 - LIMITI DEL METODO**

- *C. dubliniensis* è β-esosaminidasi positiva e cresce con colonie verde-blu e quindi non è differenziabile da *C. albicans*.
- Il terreno non distingue tra *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*.⁵
- Lo sviluppo migliore del colore delle colonie di *Candida* spp. si ottiene dopo 48 ore di incubazione.⁵
- Le specie di *Candida* diverse da *C. albicans*/*C. dubliniensis* e *C. tropicalis* appaiono con una varietà di colori rosa/grigio/viola, a causa della pigmentazione naturale delle colonie e dei cromofori rilasciati. L'esperienza del microbiologo può aiutare a differenziare queste specie con l'osservazione del colore e della morfologia delle colonie
- Il tasso di crescita sulle piastre dipende anche dalle richieste nutrizionali dei lieviti. È possibile che certi ceppi con particolari caratteristiche metaboliche non crescano sul terreno o crescano privi di colore.
- Alcuni rari ceppi batterici resistenti al cloramfenicolo, possono crescere sul terreno con colonie colorate.
- 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. Polacheck I, Melamed M, Bercovier H, Salkin IF. Beta-Glucosidase in *Candida albicans* and its application in yeast identification. *J Clin Microbiol* 1987;25:907-10.
2. Perry JL, Miller GR. Umbelliferyl-labeled galactosaminide as an aid in identification of *Candida albicans* *J Clin Microbiol* 1987;25:2424-5.
3. Willinger BW, Manafi M, Rotter ML. Comparison of rapid methods using fluorogenic-chromogenic assays for detecting *Candida albicans*. *Letters App Microbiol* 1994; 18:47-49
4. Perry JD. A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clin Microbiol Rev.* 2017 Apr;30(2):449-479.
5. Andreoni S., Molinari G.L., Ruzza P., Dellera A. Evaluation of Chromogenic *Candida* Agar for isolation and presumptive identification of yeasts. XLI AMCLI Italian Clinical Microbiologists Association Congress Rimini, November 13-16, 2012.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	oREF	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 2	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	10/2020

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

