

FUNGIFAST® AFG

Mielių jautrumo priešgrybeliniams preparatams nustatymas

12 tyrimų (Kat. Nr. 44412)

CPB 0308_LT-2016-04
Tik in vitro diagnostikai, tik profesionaliam naudojimui



1 – PASKIRTIS
FUNGIFAST AFG rinkinys yra skirtas nustatyti pagrindinių žmogaus patogeninių mielių jautrumą įvairiems priešgrybeliniams preparatams, naudojamiems tariamoms ar sisteminėms mikozėms gydyti.

2 – IVADAS
Pastebimas grybelinių infekcijų dažnėjimas yra susijęs su mikozių gydymu ir jų atsparumu vaistams. Didėjant vaistų pasiūlai, parenkant tinkamus gydymui vaistus, būtina atlikti jų aktyvumo įvertinimą.
CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), ir EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing) jautrumo priešgrybeliniams preparatams parinkimo referentiniai metodai yra sudėtingi ir netinkami rutininiams tyrimams.
FUNGIFAST AFG tyrime panaudojamas kolorimetrinis terpės mikropaskiedimo metodas. Tyrimas yra greitas, paprasta atlikimo metodika, lengvai įvertinamas ir tinkamas naudoti visoms klinikinėms laboratorijoms. Be to, FUNGIFAST AFG pilnai atitinka naudojamus standartinius metodus.

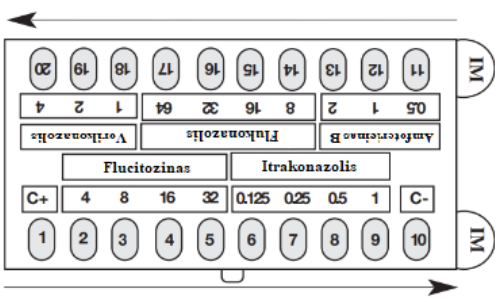
3 – PRINCIPAS
Mielių jautrumo priešgrybeliniams preparatams nustatymas pagrįstas mielių augimu ar neaugimu esant trims ar keturioms įvairių priešgrybelinių preparatų koncentracijoms. Augimą skystoje terpėje parodo terpės spalvos pasikeitimas. Mielėms fermentuojant gliukozę, redukuojasi redoks indikatorius, todėl keičiasi terpės spalva iš tamsiai violetinės į rausvą ar bespalvę.
Rezultatai vertinami po 24 valandų inkubavimo. Pirmiausia įvertinami spalviniai pasikeitimai teigiamos augimo kontrolės (C+) šulinėlyje. Šiame šulinėlyje nėra priešgrybelinių preparatų, jis inokuliuotas MES FUNGI terpe su priedais.
Neįvykęs spalvinis pasikeitimas neigiamos augimo kontrolės (C-) šulinėlyje palengvina kitų šulinėlių spalvinį vertinimą. Šiame šulinėlyje nėra priešgrybelinių preparatų, jis inokuliuotas MES FUNGI terpe be priedų.

4 – REAGENTAI		
Aprašymas	Kiekis	
SUSPENSION FUNGI : 4 mL buteliukas su buferizuota agarų terpe, kurios sudėtyje yra Bacto agaras, kolimicinas ir vankomicinas, skirti naudojamų kolonijų suspendavimui ir standartizavimui.	14	
MES FUNGI : 5 mL buteliukas su skysta terpe (modifikuota RPMI terpė) jautrumo tyrimui, kurios sudėtyje yra resazurinas (augimo indikatorius) ir gliukozė.	12	
TC FUNGI : 4 mL buteliukas su bario sulfato tirpalu, skirtas inokulianto standartizavimo kontrolei.	1	
FUNGIFAST AFG : 20 šulinėlių plokštelė, skirta vienam mėginiui iširti, supakuota individualioje hermetinėje folijos pakuotėje.	12	

Plokštelės kompozicija
FUNGIFAST AFG plokštelė : šulinėliuose yra tirpalai su tam tikromis priešgrybelinių preparatų koncentracijomis :

1 šulinėlis (C+): (0 µl/mL)	11 šulinėlis (AB): (0,5 µl/mL)
2 šulinėlis (5FC): (4 µl/mL)	12 šulinėlis (AB): (1 µl/mL)
3 šulinėlis (5FC): (8 µl/mL)	13 šulinėlis (AB): (2 µl/mL)
4 šulinėlis (5FC): (16 µl/mL)	14 šulinėlis (FCZ): (8 µl/mL)
5 šulinėlis (5FC): (32 µl/mL)	15 šulinėlis (FCZ): (16 µl/mL)
6 šulinėlis (ITZ): (0,125 µl/mL)	16 šulinėlis (FCZ): (32 µl/mL)
7 šulinėlis (ITZ): (0,25 µl/mL)	17 šulinėlis (FCZ): (64 µl/mL)
8 šulinėlis (ITZ): (0,5 µl/mL)	18 šulinėlis (VRZ): (1 µl/mL)
9 šulinėlis (ITZ): (1 µl/mL)	19 šulinėlis (VRZ): (2 µl/mL)
10 šulinėlis (C-): (0 µl/mL)	20 šulinėlis (VRZ): (4 µl/mL)

Molekulė	Trumpinys	Vaistas
Amfotericinas B	AB	FUNGIZONE (įprastinis) ABELCET, AMBISONE (liposominis) ANCOTIL
Flucitozinas	5FC	TRIFLUCAN
Flukonazolis	FCZ	SPORANOX
Itrakonazolis	ITZ	VFEND
Vorikonazolis	VOR	



5 – ATSARGUMO PRIEMONĖS
• Reagentai skirti tik in vitro diagnostikai ir juos turi naudoti tik specialistai.
• Mėginiai ir inokuliuoti reagentai yra potencialiai pavojingi, galintys sukelti infekciją; juos privaloma naudoti atsargiai, vadovaujantis šalies higienos normomis ir šio tipo produktams naudojimo šalyje galiojančiais reglamentais.
• Talpos su pavojingomis medžiagomis turi būti naudojamos atsargiai (daugiau informacijos ieškokite medžiagos saugos duomenų lape).
• Nenaudokite reagentų pasibaigus jų galiojimo laikui.
• Nenaudokite pažeistų ar prieš naudojimą užterštų reagentų.

6 – MĖGINIŲ PAĖMIMAS
Jautrumo tyrimams atlikti naudojamos kolonijos turėtų būti šviežios (iki 24 valandų senumo) ir puikiai išskirtos 37°C temperatūroje (ar 30°C temperatūroje *Cryptococcus neoformans*) ant agarizuotos terpės, pageidautina Petri lėkštelėje. Rekomenduojama kolonijų išskyrimui naudoti mielėms specifines terpes. Galima naudoti chromogeninę CANDICHRON II terpę iš ELITech MICROBIO(kat. Nr. 44211 ar kat. Nr. 44212).

7 – REAGENTŲ LAIKYMAS
Rinkinys ir jame esantys reagentai išlieka stabilūs, laikant juos 2 - 8°C temperatūroje originaliose pakuotėse, ir gali būti naudojami iki galiojimo datos, nurodytos ant pakuotės. Reagentai paruošti naudojimui ir turi būti sunaudoti iš karto po atidarymo.

8 – REIKALINGI, BET NETIEKIAMI REAGENTAI IR PRIEMONĖS
• Parafino aliejus
• Sterilios PASTERO pipetės / 10 µL ir 100µL mikropipetės
• 37°C ir 30°C (tik *Cryptococcus*) temperatūros termostatas
• Užterštų atliekų kontaineris

9 – PROCEDŪRA
Prieš naudojimą leiskite reagentams pasiekti kambario temperatūrą (18-25°C)

9.1 Inokulianto paruošimas
Uždara Pastero pipete paimkite 2 ar 3 išskirtas kolonijas ir jomis inokuliuokite SUSPENSION FUNGI buteliuką. Gerai išmaišykite. Inokulianto standartizaciją galima atlikti trimis skirtingais būdais:

- * Su densitometru
Densitometro pagalba patikrinkite inokulianto drumstumą, jis turi būti **2 Mac Farland**. Esant poreikiui sureguliuokite drumstumą taip, kaip aprašyta aukščiau.
- * Palyginant su TC FUNGI buteliuku
Sureguliuokite paruošto SUSPENSION FUNGI inokulianto drumstumą lygindami su TC FUNGI buteliuko drumstumu, įvertindami ant buteliuko etiketės atspausdintas juodas linijas. Jei suspensinė terpė yra šviesesnė (nepakankamas inokuliantas), papildomai dar užsėkite mėgintuvėlį, kol drumstumas bus lygiavertis esančiam drumstumo kontroliniam buteliuke.
Jei paruošta suspensinė terpė yra labiau drumsta (per daug koncentruotas inokuliantas), skieskite ją su SUSPENSION FUNGI iš kito naujai atidaryto buteliuko, kol pasieksite tinkamą drumstumą.
- * Skaičiuojant Malassez kameroje
Standartizuoti inokuliantą galima skaičiuojant mieles Malassez kameroje. Inokuliuoto tirpalo koncentracija turėtų būti 10⁶-10⁷ mielių/mL.

9.2. Plokštelės inokuliacija
Neigiama kontrolė
Pažymėkite FUNGIFAST AFG plokštelę identifikaciniu kodu. Nuimkite plokštelę dengiančią lipnią plėvelę ir į 10 (C-) kontrolės šulinėlį įlašinkite :
- 100 µL neinokuliuoto MES FUNGI
- 2 lašus parafino aliejaus
MES FUNGI terpės inokuliacija
Inokuliuokite MES FUNGI terpę 10 µL užsėtos SUSPENSION FUNGI terpės, kuri buvo standartizuota (§9.1). Gerai sumaišykite.

Plokštelės inokuliacija
Į kiekvieną šulinėlį, išskyrus jau pripildytą 10 (C-) šulinėlį, sulašinkite:
- 100 µL užsėtos MES FUNGI
- 2 lašus parafino aliejaus.
Plokštelės šulinėlius vėl uždenkite lipnia juoste.

9.3. Plokštelės inkubavimas
Plokštelę inkubuokite 24 valandas 37°C temperatūroje, jei yra poreikis, ir priklausomai nuo kamieno, inkubavimo laiką galima pratęsti iki 48 valandų.
Pastaba: Rezultato negalima vertinti po 18-20 valandų inkubavimo, net jei

kontrolės šulinėlyje spalva pasikeitusi. Rezultatą vertinti galima tik po 24 valandų inkubavimo.

- *Cryptococcus neoformans* atveju plokštelę inkubuokite 30°C temperatūroje, esant poreikiui inkubavimo laiką galima pratęsti iki 72 ar 96 valandų.

10 – PLOKŠTELĖS REZULTATŲ IVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Spalviniai terpės pasikeitimai šulinėliuose iš tamsiai violetinės į rausvą ar bespalvę parodo, kad tiriamas štamas gali augti esant tam tikrai vaisto koncentracijai.

Tačiau, jei nėra spalvinio pasikeitimo, tai parodo, kad štamas yra atsparus tam tikrai vaisto koncentracijai.

10.1 Patvirtinimas (teigiamos kontrolės šulinėlis C+)

Patikrinkite, ar augimo teigiamos kontrolės šulinėlyje (C+) esančios terpės spalva tapo rausva ar bespalvė, jei ne, tai prailginkite inkubavimo laiką (9.3). *C.neoformans* atveju rezultatus galima vertinti, kai tik C+ šulinėlyje spalva pasikeitė į šviesiai violetinę.

10.2 Neigiamos kontrolės įvertinimas (neigiamos kontrolės šulinėlis C-)

Palyginkite spalvinius pasikeitimus šulinėliuose su augimo neigiamos kontrolės šulinėliu (C-), kurio spalva išliko nepasikeitusi.

10.3 Rezultatų vertinimas

Norint pagreitinti rezultatų vertinimą, naudokite su rinkiniu pateikiamą rezultatų lentelę. Rezultatas galima pateikti kaip minimalias inhibicines koncentracijas arba klinikinės klasifikacijos formose.

Minimali inhibicinė koncentracija (MIC)

MIC pateikiama kaip mažiausia koncentracija, kurioje nestebimas augimas (pirmam šulinėliui išliekant tamsiai violetiniam).

Klinikinė klasifikacija (S/I ar S-DD/R)

Štamas yra jautrus (S), tarpinis (I), jautrus tam tikrai dozei (S-DD) ar atsparus (R) kaip nurodyta žemiau esančioje priešgrybelinių preparatų ribinių koncentracijų lentelėje.

Ribinės koncentracijos µg/mL, *Candida spp. atveju:*

	S	I	SDD	R
Amfoterinas B*	ND	ND	-	ND
Flucitozinas**	≤ 4	8-16	-	≥ 32
Itrakonazolis**	≤ 0,125	-	0,25-0,5	≥ 1
Flukonazolis**	≤ 8	-	16-32	≥ 64
Vorikonazolis**	≤ 1	-	2	≥ 4

ND – nenustatyta

* - amfotericinui, MIC > 2µg/mL parodo galimą atsparumą

** - NCCLS nustatyta koncentracija

10.4 Pastabos

C. krusei būdingas atsparumas flukonazolui, ir šio priešgrybelinio preparato atveju jis sistemiskai turi būti vertinamas kaip (R).

11 – KOKYBĖS KONTROLĖ

Rekomenduojama atlikti periodinę metodo standartizacijos kokybės kontrolę, naudojant referentinius kamienus *Candida albicans* ATCC 90029 ir *Candida krusei* ATCC 6258.

Laukiamos MIC reikšmės pateikiamos sekančioje lentelėje :

Tikrintas priešgrybelinis preparatas	<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258
	24 valandos	24 valandos
Amfoterinas B	≤ 0,5 µg/mL	≤ 0,5µg/mL
Flucitozinas	≤ 4 µg/mL	≤ 4-16 µg/mL
Itrakonazolis	≤ 0,125-0,5µg/mL	0,125-1µg/mL
Flukonazolis	≤ 8 µg/mL	32 - ≥ 64 µg/mL
Vorikonazolis	≤ 1µg/mL	≤ 1µg/mL

12 – KLAIDŲ PRIEŽASTYS

- Inokuliatas paruoštas iš negrynos kultūros, ar iš ilgiau nei 24 valandas augintų izoliuotų kolonijų.
- Plokštelės inkubavimas aukštesnėje nei 380C temperatūroje.
- Rezultato vertinimas anksčiau nei po 24 valandų inkubavimo (pvz. 18-20 valandų).
- Rezultatų vertinimas, dar nepasikeitus augimo indikatoriaus spalvai.
- Rezultatų vertinimas praėjus 24-48 valandoms po spalvos pasikeitimo augimo kontrolės šulinėlyje.

Bendrai, kai nesilaikoma šiose instrukcijose pateiktų rekomendacijų.

13 – APRIBOJIMAI

Šis *in vitro* metodas jautrumui priešgrybeliniams preparatams nustatyti turi tik priešgrybelinių vaistų ir mielių sąveikos nurodomąją vertę gydymo metu *in vivo*.

- Esant itrakonazoliui, flukonazoliui, vorikonazoliui, gali būti stebimas išilginis augimas, iš dalies *Candida albicans* atveju. Stebimas nepilnas spalvos pasikeitimas (šviesiai violetinė), kuris yra identiškas visuose šulinėliuose su tuo pačiu vaistu.

14 – ATLIKIMO CHARAKTERISTIKOS

Atlikimo charakteristikos įvertintos naudojant skirtingus kamienus (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*), išskirtus iš mikologinių mėginių, gautų iš skirtingų ligoninių skyrių bei bendruomenės sveikatos įstaigų pacientų.

Lygiagrečiai buvo atlikta palyginamoji studija su referentiniais metodais: EUCAST mikropaskiedimo metodas (išskyrus Amfotericiną B) ir E-Test metodas iš AB Biodisk. Kategorijų sutapimo procentai pateikti žemiau esančioje lentelėje:

	AB	5-FC	ITZ	FCZ	VRZ	% CA
	ND	n = 56	n = 56	n = 56	n = 56	-
EUCAST	ND	92.9 %	69.6 %	73.2 %	92.9 %	82.2 %
	n = 100	n = 99	n = 99	n = 99	n = 100	-
E-TEST	99 %	90.9 %	79.8 %	84.8 %	97 %	90.3 %

ND: Nenustatyta

% CA: Kategorijų sutapimo %.

Atsižvelgiant į inkubavimo laikus, 93.3% (97/104) kamienų rezultatai gauti po 24 valandų.

15 – ATLIEKŲ UTILIZAVIMAS

Atliekos turi būti utilizuojamos laikantys naudojimo šalyje nustatytų higienos normų ir šio tipo produktams galiojančių reglamentų

16 – LITERATŪRA

Subcommittee of Antifungal Testing of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2002. Method for the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by Broth Dilution of Fermentative Yeasts. EUCAST Discussion document E. Dis. 7.1 ESCMID.

Rex J.H., M.A. Pfaller, Walsh T.J., Chaturvedi V., Espinel-Ingroff A., Ghannoum M.A., Gosey L.L., Odds F.C., Rinaldi M.G., Sheehan D.J. and Warnock D.W. 2001. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and current Challenges. Clinical Microbiology Reviews, **14**(4):643-658.

FUNGIFAST® yra ELITech MICROBIO prekinis ženklas

Pakeitimai nuo ankstesnės versijos paryškinti pilka spalva.



ELITech MICROBIO
Parc d'activités du plateau
19, allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
Tel : 33 (0)4 94 88 55 00
<http://elitechgroup.com>