

FUNGIFAST® AFG

Mayalarda antifungal duyarlılık testi

12 test (Ref. 44412)

CPB 0308_TR-2016-04

Yalnızca *in vitro* diagnostik kullanım içindir, sadece profesyonel kullanıma yöneliktir



1 - KULLANIM AMACI

FUNGIFAST AFG kiti, yüzeysel veya sistemik mikozların tedavisinde kullanılan ana insan patojenik mayalarından çeşitli antifungal ajanlara duyarlılığın belirlenmesine olanak sağlar.

2 - GİRİŞ

Tedaviye dirençli mikozların ortaya çıkması gibi nozokomiyal veya toplum kökenli mantar enfeksiyonlarının sıklığı artmaktadır. Yeni ilaçların ticarileştirilmesiyle, antifungal ajanların mayalardaki aktivitesinin değerlendirilmesine ihtiyaç vardır. Antifungal duyarlılık testine yönelik CLSI (Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü) ve EUCAST (Avrupa Antibiyotik Duyarlılık Testi Komitesi) referans yöntemleri, rutin kullanımı için uygun olmayan zahmetli tekniklerdir. FUNGIFAST AFG testi, kolorimetrik sıvı besiyeri mikrodilüsyon yöntemini kullanır. Test hızlıdır, kullanımı ve okunması kolaydır ve tüm klinik laboratuvarlar için uygundur. Ayrıca, FUNGIFAST AFG standart yöntemler ile oldukça uyumludur.

3 - PRENSİP

Antifungal duyarlılığın belirlenmesi, üç veya dört konsantrasyonda test edilen çeşitli antifungal ajanların varlığında mayaların gelişmesine veya gelişmemesine dayanır. Sıvı ortamdaki gelişme, ortamın renk değişimi ile kendini gösterir. Glikozun mayalar tarafından fermentasyonu redoks göstergesinin azalmasına yol açar, bu da ortamın koyu mordan pembeye veya renksiz hale gelmesine neden olur. Sonuçlar, gelişme pozitif kontrol kuyusundaki (C+) renk değişikliğini takiben 24 saatlik inkübasyondan sonra yorumlanır. Antifungal ajan içermeyen ilgili kuyu, MES FUNGI menşeli ortam ile inoküle edilir. Negatif kontrol kuyusunda (C-) renk değişikliğinin olmaması, diğer kuyulardaki sonuçların yorumlanmasını kolaylaştırır. Antifungal ajan içermeyen ilgili kuyu, MES FUNGI menşeli olmayan ortam ile inoküle edilir.

Açıklama	Miktar
SUSPENSION FUNGI: Koloni SUSPENSIONu ve standardizasyonu için 4 mL şişede Bacto Agar, colimycin ve vancomycin içeren bufferli yarı agar ortamı.	14
MES FUNGI: Resazurin (büyüme göstergesi) ve glikoz içeren duyarlılık testi için 5 mL'lik sıvı ortam (modifiye RPMI ortamı).	12
TC FUNGI : İnokül standardizasyonunun kontrolü için 4 mL şişede baryum sülfat solüsyonu.	1
FUNGIFAST AFG : Alüminyum poşet içinde ayrı ayrı paketlenmiş bir numunenin test edilmesine olanak sağlayan 20 kuyulu tepsi.	12

4 - REAKTİFLER

Tepsinin bileşimi

FUNGIFAST AFG tepsisi aşağıdaki konsantrasyonlarda çeşitli antifungal ajanlar içerir:

kuyu 1 (C+): (0 µg/mL)	kuyu 11 (AB): (0.5 µg/mL)
kuyu 2 (5FC): (4 µg/mL)	kuyu 12 (AB): (1 µg/mL)
kuyu 3 (5FC): (8 µg/mL)	kuyu 13 (AB): (2 µg/mL)
kuyu 4 (5FC): (16 µg/mL)	kuyu 14 (FCZ): (8 µg/mL)
kuyu 5 (5FC): (32 µg/mL)	kuyu 15 (FCZ): (16 µg/mL)
kuyu 6 (ITZ): (0,125 µg/mL)	kuyu 16 (FCZ): (32 µg/mL)
kuyu 7 (ITZ): (0,25 µg/mL)	kuyu 17 (FCZ): (64 µg/mL)
kuyu 8 (ITZ): (0,5 µg/mL)	kuyu 18 (VRZ): (1 µg/mL)
kuyu 9 (ITZ): (1 µg/mL)	kuyu 19 (VRZ): (2 µg/mL)
kuyu 10 (C-): (0 µg/mL)	kuyu 20 (VRZ): (4 µg/mL)

Molekül

Amfoterisin B

Flucytosine

Flukonazol

İtrakonazol

Vorikonazol

Kısaltma

AB

5FC

FCZ

ITZ

VOR

İlaç

FUNGIZONE (konvansiyonel)

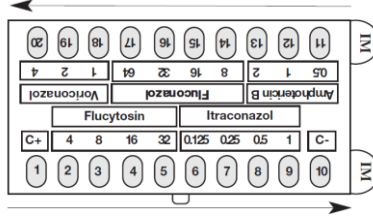
ABELCET, AMBISONE (lipozomal)

ANCOTIL

TRIFLUCAN

SPORANOX

VFEND



5 - ÖNLEMLER

- Bu kit içindeki reaktifler sadece *in vitro* kullanım içindir ve yetkili personel tarafından kullanılmalıdır.
- Numuneler ve inoküle edilmiş reaktifler potansiyel olarak bulaşıcıdır ve kullanılacak ülkenin hijyen kurallarına ve bu tür ürün için yürürlükteki düzenlemelere dikkat edilerek kullanılmalıdır.
- Tehlikeli madde içeren tepsilere dikkatli kullanılmalıdır (daha fazla bilgi için malzeme güvenliği veri sayfasına bakın).
- Reaktifleri son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
- Açılmadan önce hasar görmüş veya iyi korunmamış reaktifleri kullanmayın.

6 - ÖRNEK TOPLAMA

Duyarlılık testini gerçekleştirmek için kullanılan koloniler genç (en fazla 24 saatlik) olmalı ve agar ortamında, tercihen bir Petri kabında 37°C'de (veya Cryptococcus neoformans için 30°C'de) mükemmel şekilde izole edilmelidir. İzolasyonun mayalara özgü ortamlarda yapılması tavsiye edilir. ELITech MICROBIO'dan kromojenik CANDICHRON II ortamı (Kat. N° 44211 or Kat. N° 44212) kullanılabilir.

7 - REAKTİF STOKU

Kit ve içeriği 2-8°C'de orijinal hallerinde saklandığında kutuda belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

Reaktifler kullanıma hazırdır ve açıldıktan hemen sonra kullanılmalıdır.

8 GEREKLİ OLAN FAKAT SAĞLANMAYAN REAKTİFLER

- Parafin yağı
- Steril PASTÖR pipetleri / 10 µL ve 100 µL mikropipetler
- 37°C ve 30°C'de inkübatör (sadece Cryptococcus için)
- Kontamine atıklar için atık konteyneri

9 - PROSEDÜR

Reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına (18 - 25°C) getirilmelidir.

9.1. İnokulum hazırlama

Kapatılmış Pastör pipeti ile iki veya üç izole koloni alın. SUSPENSION FUNGI şişesini kolonilerle inoküle edin. İyice karıştırın. İnokulum standardizasyonu üç farklı şekilde gerçekleştirilebilir:

• Densitometre ile

Bir dansitometreyle inoküle edilmiş SUSPENSION ortamının bulanıklığının 2 Mac Farland'a eşit olduğunu doğrulayın. Gerekirse bulanıklığı ayarlamak için yukarıdaki işlemleri yapınız.

• TC FUNGI Şişesine Göre

Şişenin üzerindeki etiketlere basılmış siyah çizgiler yardımıyla inoküle edilmiş SUSPENSION FUNGI'nin opaklığını TC FUNGI'ndeki opaklığa ayarlayın. TC FUNGI with the aid of the black lines printed on the vial labels.

SUSPENSION ortamı daha hafifse (yetersiz inokulum), elde edilen opaklık Bulanıklık Kontrolü şişesindeki eşit olana kadar şişeyi yeniden tohumlayın. SUSPENSION ortamı daha bulanıksa (inokulum çok yoğun), doğru bulanıklık elde edilene kadar yeni açılan bir şişeden SUSPENSION FUNGI ile dilüe edin.

• Malassez Hücrelerinde Sayım

Malassez hücrendeki mayaları sayarak inokulum standardizasyonu mümkündür. Malassez cell. Elde edilen solüsyonda mL başına 10⁶-10⁷ maya olmalıdır.

9.2. Tepsinin inokülasyonu

Negatif kontrol

Test edilen örneği tanımlamak için FUNGIFAST AFG tepsisini işaretleyin. Yapışkan bandı kaldırın ve kuyu 10'a (C-) aşağıdaki gibi dağıtın:

- MES FUNGI menşeli olmayan 100 µL,

- 2 damla parafin yağı.

MES FUNGI ortamının inokülasyonu

MES FUNGI ortamını önceden standardize edilen SUSPENSION FUNGI menşeli 10 µL ile inoküle edin (§9.1). İyice karıştırın.

Tepsinin inokülasyonu

Aşağıdakileri, önceden doldurulmuş olan 10 (C-) kuyu hariç, her bir kuyuya dağıtın:

- MES FUNGI menşeli 100 µL,

- 2 damla parafin yağı.

Tepsiyi yapışkan bantla kapatın.

9.3. Tepsinin inkübasyonu

Tepsiyi 37°C'de 24 saat inkübe edin; gerekirse suşa bağlı olarak, bu inkübasyon 48 saate kadar uzatılabilir.

Not: Pozitif kontrol kuyusu renk değiştirmiş olsa bile, henüz 18-20 saatlik inkübasyon evresindeyken okumayın. Sonuçları okumadan önce 24 saatlik süreye uyulmalıdır.

- Cryptococcus neoformans için, tepsiyi 30°C'de inkübe edin ve gerekirse inkübasyon süresini 72 veya 96 saate kadar uzatın.

10 - OKUMA VE YORUMLAMA

Ortam renginin başlangıçta koyu mor - pembeye veya renksizliğe değişimi, test edilen suşun, bu kuyuda test edilen antifungal konsantrasyonun varlığında büyüyeceğini gösterir.

Bununla birlikte, herhangi bir renk değişikliği görülmediğinde, suş, test edilen antifungal konsantrasyonda inhibe edilmiştir.

10.1 Validasyon (pozitif kontrol kuyu C+)

Büyüme kontrol (C+) ortamının pembe veya renksiz hale geldiğini doğrulayın, aksi takdirde inkübasyon süresini uzatın (9.3).

C. neoformans için, C+ kuyusunun ortamı açık mor renge dönüştüğünde sonuçlar okunabilir.

10.2 Negatif kontrolün okunması (negatif kontrol kuyusu C-) Renk değişikliğini, ortamın orijinal rengini içeren negatif kontrol kuyusuyla (C-) karşılaştırın.

10.3 Sonuçların Yorumlanması

Yorumlamayı kolaylaştırmak için kite dahil edilen sonuç sayfasını kullanın. Sonuçlar minimum inhibitör konsantrasyonlar veya klinik kategorizasyonlar olarak ifade edilebilir.

Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIC)

MIC, hiçbir büyümenin gözlenmediği en düşük konsantrasyon olarak verilir (ilk kuyu koyu morda kalır).

Klinik sınıflandırma (S / I veya S-DD / R)

Suş, aşağıdaki tabloda açıklanan antifungal ajan kritik değerlerine göre Duyarlı (S), Orta (I) / Duyarlı - Doza Bağımlı (S-DD) veya Dirençlidir (R): Candida spp. için µg / mL cinsinden kritik değerler :

	S	I	SDD	R
Amfoterisin B*	ND	ND	-	ND
Flusitozin**	≤ 4	8-16	-	≥ 32
İtrakonazol**	≤ 0.125	-	0,25-0,5	≥ 1
Flukonazol**	≤ 8	-	16-32	≥ 64
Vorikonazol **	≤ 1	-	2	≥ 4

ND :Belirlenemedi.

Amfoterisin için bir MIC > 2 ug/mL olası direnci gösterir.

** : Konsantrasyonlar CLSI tarafından belirlenir.

10.4 Notlar

C. krusei, flukonazole karşı doğal olarak dirençlidir ve sistematik olarak bu antifungal ajan için (R) olarak rapor edilmelidir.

11 - KALİTE KONTROL

Yöntem standardizasyonunun referans suşlar, Candida albicans ATCC 90028 ve Candida krusei ATCC 6258 kullanılarak zaman zaman doğrulanması tavsiye edilir. Beklenen MIC değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir:

Test edilen antifungal	Candida albicans ATCC 90028	Candida krusei ATCC 6258
	24 saat	24 saat
Amfoterisin B	≤ 0,5 µg/mL	≤ 0,5 µg/mL
Flusitozin	≤ 4 µg/mL	≤ 4-16 µg/mL
İtrakonazol	≤ 0,125 - 0,5 µg/mL	0,125-1 µg/mL
Flukonazol	≤ 8 µg/mL	32 - ≥ 64 µg/mL
Vorikonazol	≤ 1 µg/mL	≤ 1 µg/mL

12 - HATA NEDENLERİ

- İnokulumun karışık kültürden veya 24 saatten fazla büyütülmüş izole kolonilerle hazırlanması.
- Tepsinin 38°C'den daha yüksek sıcaklıkta inkübasyonu.
- 24 saatlik inkübasyon süresinden önce tepsi okunması (örn: 18-20 saat) -20 saat

- Büyüme göstergesinin renk değişikliğini görmeden önce tepsi okuması
 - Tepsi, ortamın büyüme kontrol kuyusundaki rengini değiştirmesinden 24 veya 48 saat sonra okunur.
- Genel olarak, bu talimatlarda yer alan önerilere uyulmalıdır.

13 - LİMİTASYONLAR

- Anti-fungal maddelere duyarlılığın belirlenmesine yönelik bu *in vitro* yöntem, in vivo tedavi sırasında antifungal maya etkileşimi için gösterge değere sahiptir.
- İtrakonazol, flukonazol ve vorikonazol ile ilgili olarak, özellikle *Candida albicans* ile birlikte takip eden büyüme fenomeni oluşabilir. Bu, aynı antifungalı içeren kuyularda eksik renk değişimi (açık mor) ile karakterizedir.

14 - PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

Performans özelliklerinin değerlendirilmesi farklı hastane bölümlerinden ve toplum sağlığı uygulamalarındaki hastalardan elde edilen mikolojik numunelerden izole edilen farklı suşlar üzerinde (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae*, *C. krusei*, *C. kefir*, *C. guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*) gerçekleştirilmiştir. Referans yöntemlerle paralel bir karşılaştırmalı çalışma yapılmıştır: EUCAST mikrodilüsyon yöntemi (Amfoterisin B hariç) ve AB Biodisk'ten E-Test yöntemi. Sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir:

	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: Belirlenemedi

% CA: Kategori Uyumunun % 'si.

İnkübasyon süreleri ile ilgili olarak, suşların 93.3%'ü (97/104) 24 saat sonra sonuç verdi.

15 - ATIK GİDERME

Atık, kullanım ülkesinde bu tür bir ürün için hijyen kurallarına ve yürürlükteki düzenlemelere uygun olarak bertaraf edilmelidir.

16 - BİBLİYOGRAFİ

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.

MYCOFAST®, ELITech MICROBIO'nun ticari markasıdır

Önceki sürümdeki değişiklikler gri renkle vurgulanmıştır



ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
19, allée d'Athènes
83870 SIGNES FRANCE
Tel. : 33 (0)4 94 88 55 00
Fax: 33 (0)4 94 88 55 22