

## FUNGIFAST® AFG

Тест для определения чувствительности дрожжеподобных грибов к противогрибковым препаратам  
12 тестов (Кат. № 44412)

RU-2009-03\_CPВ 0308

### 1 – ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор FUNGIFAST AFG позволяет определить чувствительность основных патогенных дрожжеподобных грибов человека к различным противогрибковым препаратам, применяемым при лечении поверхностных или системных микозов.

### 2 - ВВЕДЕНИЕ

Частота внутрибольничных или приобретенных в общественных местах грибковых инфекций возрастает так же, как и появление микозов, не поддающихся лечению. Для промышленного выпуска новых лекарственных препаратов необходимо оценить эффективность подавления противогрибковыми препаратами дрожжеподобных грибов.

Эталонные методы тестирования чувствительности к противогрибковым препаратам CLSI (Института стандартов клинической лаборатории) и EUCAST (Европейского Комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам) -трудоемкие процедуры, непригодные для повседневного применения. В тесте FUNGIFAST AFG используют метод колориметрической оценки микроразведений питательной среды. Тест быстрый, простой, результат легко считывается и метод удобный для всех клинических лабораторий. Более того, FUNGIFAST AFG хорошо согласуется со стандартными методами.

### 3 - ПРИНЦИП

Определение чувствительности к противогрибковым препаратам основывается на оценке роста дрожжеподобных грибов или его подавления в присутствии трех-четырёх концентраций различных противогрибковых препаратов.

Рост в жидкой среде проявляется изменением ее цвета. Ферментация глюкозы дрожжеподобными грибами приводит к восстановлению окислительно-восстановительного индикатора, в результате чего цвет среды меняется с темно-фиолетового на розовый или бесцветный. Результаты можно интерпретировать после 24-часовой инкубации, сразу после изменения цвета в лунке положительного контроля роста (C+). Данная лунка не содержит противогрибкового препарата и заполняется засеянной средой MES FUNGI.

Неизменность цвета исходной среды в лунке отрицательного контроля (C-) облегчает интерпретацию результатов в других лунках. Эта лунка, также не содержит противогрибковый препарат, но заполняется чистой незасеянной средой MES FUNGI.

### 4 - РЕАГЕНТЫ

Описание	Количество
<b>SUSPENSION FUNGI:</b> 4-мл флакон с буферным раствором полужидкой среды, для суспендирования и стандартизации инокулята, содержащей бакто-агар, колимицин и ванкомицин	14
<b>MES FUNGI:</b> 5-мл флакон с жидкой питательной средой (модифицированная среда RPM) для проведения теста на чувствительность, содержащей резазурин (индикатор роста) и глюкозу.	12
<b>TC FUNGI:</b> 4-мл флакон с раствором сульфата бария для проверки стандартности инокулята.	1
<b>FUNGIFAST AFG:</b> палочка с 20 лунками для тестирования одной пробы, отдельно запечатанная в алюминиевую упаковку	12

### Содержимое палочки:

Палочка FUNGIFAST AFG содержит различные противогрибковые препараты в следующих концентрациях:

Лунка 1 (C+): (0 µg/mL)	Лунка 11 (AB): (0.5 µg/mL)
Лунка 2 (5FC): (4 µg/mL)	Лунка 12 (AB): (1 µg/mL)
Лунка 3 (5FC): (8 µg/mL)	Лунка 13 (AB): (2 µg/mL)
Лунка 4 (5FC): (16 µg/mL)	Лунка 14 (FCZ): (8 µg/mL)
Лунка 5 (5FC): (32 µg/mL)	Лунка 15 (FCZ): (16 µg/mL)
Лунка 6 (ITZ): (0.125 µg/mL)	Лунка 16 (FCZ): (32 µg/mL)
Лунка 7 (ITZ): (0.25 µg/mL)	Лунка 17 (FCZ): (64 µg/mL)
Лунка 8 (ITZ): (0.5 µg/mL)	Лунка 18 (VRZ): (1 µg/mL)
Лунка 9 (ITZ): (1 µg/mL)	Лунка 19 (VRZ): (2 µg/mL)
Лунка 10 (C-): (0 µg/mL)	Лунка 20 (VRZ): (4 µg/mL)

<u>Вещество</u>	<u>Сокращение</u>	<u>Торговое</u>	<u>название</u>
-----------------	-------------------	-----------------	-----------------

Амфотерицин В	AB	FUNGIZONE (традиционный)	
		ABELCET, AMBISONE (липосомный)	
Флюцитозин	5FC	ANCOTIL	
Флюконазол	FCZ	TRIFLUCAN	
Итраконазол	ITZ	SPORANOX	
Вориконазол	VOR	VFEND	

### 5 - МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Данные реагенты предназначены только для *in vitro* диагностики, поэтому работать с ними должен персонал, имеющий на это разрешение.

- Пробы и посевной материал могут являться источником инфекции, поэтому с ними необходимо обращаться с предосторожностью, соблюдая санитарные нормы и правила для работы с подобными препаратами, предусмотренные в стране пользователя.

- В некоторых лунках палочки находится сырье животного происхождения, с которыми нужно обращаться осторожно.

- В некоторых лунках палочки находятся химические вещества, с которыми нужно обращаться осторожно.

- Нельзя использовать реагенты после истечения срока их годности.

- Нельзя использовать реагенты, которые испорчены или неправильно хранились до использования.

### 6 – ВЫДЕЛЕНИЕ И ОТБОР КОЛОНИЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения теста на чувствительность следует брать колонии из молодой чистой культуры (до 24 часов роста), выделенной на плотной питательной среде на чашках Петри при температуре 37°C (или при 30°C для *Cryptococcus neoformans*). Рекомендуется проводить выделение чистой культуры на средах предназначенных для дрожжеподобных грибов. Можно использовать хромогенную среду CANDICHRON II производства компании ELITech MICROBIO (Кат. № 44211 или Кат. № 44212).

### 7 – ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Набор и его содержимое при хранении при 2-8°C в их исходном состоянии стабильны до истечения срока годности, указанного на упаковке. Реагенты готовы к использованию и их необходимо использовать сразу же после того, как их открыли.

### 8 - НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ПОСТАВЛЯЮТСЯ

- Парафиновое масло
- Стерильные Пастеровские пипетки/микропипетки на 10 µL и 100 µL
- Термостат для поддержания  $t$  37°C и 30°C (только для *Cryptococcus*)

- Емкость для контаминированных отходов.

### 9 - МЕТОДИКА

Перед использованием реагентов дать им достичь комнатной температуры (18-25°C).

#### 9.1. Приготовление инокулята

Собрать две или три отдельные колонии с помощью проволочной петли или Пастеровской пипетки с замкнутым резервуаром для накопления. Засеять флакон SUSPENSION FUNGI собранными колониями. Тщательно перемешать. Стандартизацию суспензии посевного материала можно выполнить тремя различными способами:

- **С помощью флакона стандарта мутности TC FUNGI**

Добиться такой же мутности засеянной среды SUSPENSION FUNGI как и во флаконе стандарта мутности TC FUNGI сравнивая четкость черных линий, нанесенных на этикетки флаконов.

Если засеянная среда светлее (недостаточно посевного материала), то нужно добавлять посевной материал во флакон до тех пор, пока наблюдаемая мутность не будет такой же, как и во флаконе стандарта мутности.

Если засеянная среда слишком мутная (слишком много посевного материала), то нужно разбавлять ее SUSPENSION FUNGI из другого, только что открытого флакона, до тех пор, пока не будет достигнута нужная мутность.

- **С помощью денситометра**

Убедиться с помощью денситометра, что помутнение инокулированной среды соответствует **2 ЕД по стандарту МакФарланда**. При необходимости, поступать, как описано выше, чтобы отрегулировать мутность среды.

- **С помощью подсчета в камере Малассеза (Malassez)**

Можно стандартизировать посевной материал методом подсчета в камере Малассеза. Необходимо получить суспензию  $10^6$  -  $10^7$  клеток грибов / mL.

#### 9.2. Инокуляция палочки

##### Отрицательный контроль

Промаркировать палочку FUNGIFAST AFG для идентификации тестируемых проб.

Приподнять липкую ленту на палочке и внести в лунку 10 (C-) следующие компоненты:

- 100 µL чистой незасеянной среды MES FUNGI,

- 2 капли парафинового масла.

##### Засев среды MES FUNGI

Засеять среду MES FUNGI с помощью 10 µL предварительно стандартизованной суспензии клеток посевного материала в среде SUSPENSION FUNG (§9.1). Тщательно перемешать.

##### Инокуляция палочки

Добавить в каждую лунку, кроме лунки 10 (C-), которая уже заполнена, следующие компоненты:

- 100 µL засеянной среды MES FUNGI,

- 2 капли парафинового масла.

Плотно закрыть тест-палочку липкой лентой.

### 9.3. Инкубация плашки

Инкубировать плашку при 37°C в течение 24 часов; при необходимости и в зависимости от штамма, инкубацию можно продлить до 48 часов.

**Примечание:** не проводить учет результатов на плашке после 18-20 часов инкубации, даже если лунка положительного контроля изменила свой цвет. Время инкубации не менее 24 часов является предпочтительным для считывания результатов.

- для *Cryptococcus neoformans* плашку инкубировать при 30°C, и при необходимости продлить время инкубации до 72 или даже 96 часов.

### 10 - УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Изменение цвета среды, с первоначального темно-фиолетового на розовый или бесцветный, свидетельствует о том, что тестируемый штамм способен расти в присутствии тестируемой в этой лунке концентрации противогрибкового препарата. Отсутствие изменения цвета свидетельствует о подавлении роста тестируемого штамма указанным препаратом в данной концентрации.

#### 10.1. Подтверждение достоверности (лунка положительного контроля (C+))

Убедиться, что лунка контроля роста в среде (C+) меняет цвет на розовый или бесцветный, в противном случае время инкубации надо увеличить (9.3). Для *C. neoformans* результаты можно считать сразу, как только цвет среды в лунке C+ изменится на светло-фиолетовый.

#### 10.2. Учет отрицательного контроля (лунка отрицательного контроля (C-))

Сравнить изменение цвета в анализируемой лунке с цветом лунки отрицательного контроля (C-), цвет которой соответствует исходному цвету среды.

#### 10.3. Интерпретация результатов

Для облегчения процесса интерпретации результатов, следует пользоваться прилагаемой к набору таблицей результатов. Результаты могут быть выражены в виде минимальных ингибирующих рост концентраций (МИК) или в виде клинической классификации.

#### Минимальная ингибирующая рост концентрация (МИК)

МИК дана как самая низкая концентрация, при которой никакого роста не наблюдается (первая лунка, которая остается темно-фиолетовой).

#### Клиническая классификация (Ч / П или Ч-ДЗ / У)

Штамм может быть Чувствительным (Ч), Промежуточным (П) / Чувствительным - Дозозависимый (Ч-ДЗ) или Устойчивым (У) в соответствии с критическими значениями противогрибковых препаратов, приведенных в таблице ниже:

**Критические концентрации в цг/мл для *Candida spp.***

Препарат	Ч	П	ЧДЗ	У
Амфотерицин В*	НО	НО	-	НО
Флюцитозин**	≤ 4	8-16	-	≥32
Интраконазол**	≤ 0.125	-	0.25-0.5	≥1
Флюконазол**	≤ 8	-	16-32	≥64
Вориконазол***	≤1	-	2	≥4

НО: не определено

\*: для амфотерицина минимальная ингибирующая концентрация (МИК) > 2 µg/mL указывает на возможную устойчивость.

\*\* : концентрации, определенные по CLSI (Институт клинических лабораторных стандартов, США)

#### 10.4. ПРИМЕЧАНИЕ

*C. krusei* является естественно устойчивым к флюконазолу и неизменно должен относиться к (У) для этого противогрибкового препарата.

#### 11 – КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Стандартизацию этого метода времени от времени рекомендуется проверять с помощью эталонных штаммов, *Candida albicans* ATCC 90029 и *Candida krusei* ATCC 6258\*\*.

Ожидаемые значения МИК приведены в таблице ниже:

Препарат	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028 24 часа	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258 24 часа
Амфотерицин В	≤ 0,5µg/mL	≤ 0,5µg/mL
Флюцитозин	≤ 4µg/mL	≤ 4-16µg/mL
Интраконазол	≤ 0,125 – 0,5µg/mL	0,125-1µg/mL
Флюконазол	≤ 8µg/mL	32 - ≥ 64µg/mL
Вориконазол	≤ 1µg/mL	≤ 1µg/mL

#### 12 - ПРИЧИНЫ ПОГРЕШНОСТЕЙ

- Подготовленный посевной материал из смешанной культуры или из отдельных колоний, которые выращивали более 24 часов.
- Инкубация плашки происходила при температуре выше 38°C.
- Учет результатов плашки до истечения 24 часов инкубации (например, после 18-20 часов).
- Учет результатов плашки до появления изменения цвета индикатора роста.
- Учет результатов плашки проводили спустя 24 или 48 часов после того, как среда изменила цвет в лунке контроля роста.
- В общем, несоблюдение рекомендаций, содержащихся в инструкциях.

#### 13 – ОГРАНИЧЕНИЯ

- Данный *in vitro* метод для определения чувствительности к противогрибковым препаратам имеет индикаторное значение при взаимодействии противогрибковых препаратов и дрожжеподобных грибов во время *in vivo* лечения.
- В случае применения интраконазола, флюконазола и вориконазола может иметь место явление «ползучего» роста, в особенности, с *Candida albicans*. Это проявляется неполным изменением цвета (светло-фиолетовый), идентичным во всех лунках, содержащих один и тот же противогрибковый препарат.

### 14 - РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оценка рабочих характеристик была выполнена на различных штаммах (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*), изолированных от микробиологических проб и полученных из разных отделений больниц и от разных пациентов сети лечебных учреждений.

Параллельно было проведено сравнительное изучение с эталонными методами: методом микроразведения EUCAST (Европейский комитет по определению чувствительности к антибиотикам) (за исключением амфотерицина В) и методом Е-тест компании АВ Biodisk. Совпадение категорий в процентах дано в таблице ниже:

	AB	5-FC	ITZ	FCZ	VRZ	%CA
	НО	n = 56	n = 56	n = 56	n = 56	-
EUCAST	НО	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%

НО: Не определено

% CA: % совпадения категории

Что касается времени инкубации, 93,3% (97/104) штаммов давали результат после 24 часов.

#### 15 – УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Отходы следует уничтожать, соблюдая санитарные нормы и правила, принятые в стране использования для отходов подобного рода.

#### 16 - ЛИТЕРАТУРА

**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® является торговой маркой компании ELITech MICROBIO ATCC \*\* - Американская коллекция типовых культур микроорганизмов

### ELITech MICROBIO

Parc d'activités du plateau

19, allée d'Athènes

83870 SIGNES, FRANCE

Tel. +33 4 94 88 55 00

Fax : 33 4 94 88 55 22

