

CANDIFAST

MIELIŲ IDENTIFIKAVIMAS IR ATSPARUMO PRIEŠGRYBINIAMS PREPARATAMS NUSTATYMAS

8 tyrimai (kat.Nr.44008)
30 tyrimų (kat.Nr.44030)

CANDIFAST ES TWIN

ATSPARUMO PRIEŠGRYBINIAMS PREPARATAMS NUSTATYMAS 30 tyrimų (kat.Nr.44130)

LT-2009-03_CPB 0038



1/ PANAUDOJIMAS

CANDIFAST rinkinys yra skirtas pagrindinių mielių rūšių, susijusių su žmogaus patologijomis, apibūdinimui bei atsparumo priešgrybiniams preparatams nustatymui.

CANDIFAST ES TWIN rinkinys yra skirtas mielių atsparumo priešgrybiniams preparatams nustatymui.

2/ BENDRA INFORMACIJA

Paskutinį dešimtmetį išaugo grybinių infekcijų, ypač tų, kurias sukelia mielės, skaičius [5]. Mielės yra oportunistiniai agentai. Daugumą jų yra saprofitai, tačiau jos gali tapti patogeninėmis, kai organizme, kuriame jos gyvena, susidaro palankios sąlygos. *Mielių infekcijų plitimui skatinamieji veiksniai* : fiziologiniai veiksniai : naujagimiai, pagyvenę žmonės, nėščios moterys ir kt.; imunitiniai veiksniai : išbrinkę audiniai ir kt, *patologiniai veiksniai* : vėžys, imunodeficitas, medžiagų apykaitos sutrikimai ir kt.; *su gydymu susiję veiksniai* : antibiotikai, kontraceptiniai vaistai, imunosupresantai, jonizuojanti radiacija, chirurginis įsikišimas ir kt. *Klinikiniai požymiai*, kurie gali atsirasti veikiant mielėms yra gana įvairūs : poveikis odai (iššutimas, nagų uždegimas ir kt.), mukokutaninis poveikis (odai ir gleivėms) (burnos kandidozė, stemplės uždegimas, storosios žarnos uždegimas, makšties uždegimas ir kt.); poveikis pilvo vidaus organams ir kraujo užkrėtimas.

Priešgrybinių preparatų gausa yra glaudžiai susijusi su gydymui nepasiduodančiomis mikozėmis.

3/ TYRIMO PRINCIPAS

- **Mielės apibūdinamos** stebint :
- * tiriamo štamo atsparumą aktibiotikui, spalvos pasikeitimą į geltoną arba į fuksino raudonumą
- * tuomet, arba pagal septynių angliavandenių įsisavinimą, remiantis spalvos pasikeitimu į geltoną dėl terpės rūgštingumo padidėjimo
- * pagal ureazės aktyvumą, dėl kurio terpė tampa šarmiškesnė, o spalva kiekvienoje duobutėje pasikeičia į fuksino raudoną.
- **Atsparių mielių nustatymas** kai kuriems priešgrybiniams preparatams tyrimas paremtas mielių augimu arba inhibicija, esant įvairiems priešgrybiniams preparatams. Apie augimą sprendžiama vertinant terpės spalvinį pasikeitimą :
- * dėl fermentinio gliukozės įsisavinimo terpė, kurioje yra fenolio raudonojo, tampa rūgštingesne ir jos spalva pasikeičia į geltonąmielės, kurios gali hidrolizuoti angliavandenius, išskiria amoniaką, kuris terpę su fenolio raudonuoju šarmina, dėl šios priežasties spalva keičiasi į fuksino raudoną.

4/ RINKINIO SUDĖTIS

Reagentai	Kiekis		
	44008	44030	44130
CANDIFAST	8	30	-
CANDIFAST ES TWIN	-	-	15
R1 : 1 reagento buteliukas	10	35	35
R2 : 2 reagento buteliukas	8	30	30
TC : drumstumo kontrolės buteliukas	1	1	1

Apibūdinimai :

CANDIFAST plokštelė : kiekvienoje plokštelėje yra dvi eilės po 10 duobutes. Viena plokštelė – vienam tyrimui atlikti.

** Eilė identifikavimui

Duobutėje Nr.1 yra fenolio raudonojo, aktidiono (ACT) ir gliukozės.

Duobutėse Nr.2-Nr.8 yra fenolio raudonojo ir angliavandenių :

duobutė Nr. 2 (GLU): gliukozė
duobutė Nr. 3 (GAL): galaktozė
duobutė Nr. 4 (TRE): trehalozė
duobutė Nr. 5 (MAL): maltozė
duobutė Nr. 6 (CEL): celobiozė
duobutė Nr. 7 (RAF): rafinozė
duobutė Nr. 8 (LAC): laktozė
duobutės Nr. 9-10: tuščios.

** Eilė atsparumo tyrimui

Duobutė Nr.1 yra augimo kontrolės duobutė (C+)ir gliukozės.

Duobutėse Nr.2 - Nr.8 yra gliukozės ir vieno iš šių priešgrybinių preparatų :

duobutė Nr. 2 (AB): amfotericinas B (4 µg/mL)
duobutė Nr. 3 (NY): nistatinas (200 vienetų/mL)
duobutė Nr. 4 (FCT): flucitozinas (35 µg/mL)
duobutė Nr. 5 (ECZ): ekonazolas (16 µg/mL)
duobutė Nr. 6 (KTZ): ketokonazolas (16 µg/mL)
duobutė Nr. 7 (MCZ): mikonazolas (16µg/mL)
duobutė Nr. 8 (FCZ): flukonazolas (16 µg/mL).
duobutės Nr. 9-10: tuščios.

CANDIFAST ES TWIN plokštelė : kiekvienoje plokštelėje yra dvi eilės po 10 duobutes. Viena plokštelė – 2 identiškams CANDIFAST atsparumo priešgrybiniams preparatams tyrimams atlikti.

- **Reagentas 1** : 4 ml buferizuoto mitybinio agarų skirto praskiedimui ir identifikavimui. Sudėtis g/L distiliuoto vandens :
Jaučio ekstraktas 1,3
Kaseino peptones 1,8
Mielių ekstraktas 0,8
Amino rūgštys, vitaminai, mineralai 5,75
Šlapalas 20
Agaras 0,52
Antibiotikai 1,12
pH : 6,05 +/- 0,1
- **Reagentas 2** : 2ml YNB (mielių azoto bazė), kurios sudėtyje yra šlapalo ir fenolio raudonojo atsparumo tyrimui. Sudėtis g/L distiliuoto vandens :
Jaučio ekstraktas 1,3
Kaseino peptones 1,8
Mielių ekstraktas 0,8
Amino rūgštys, vitaminai, mineralai 8,75
Šlapalas 20
Gliukozė 8,5
Agaras 0,052
Antibiotikai 1,16
pH : 7,3 +/- 0,1
- **Praskiedimo kontrolė** : 4 mL su bario sulfato tirpalu.

5/ JSPĖJIMAI

- Reagentai skirti in vitro diagnostikai ir gali būti naudojami tik specialisto.
- Mėginiai ir inokuliuoti reagentai yra potencialiai pavojingi, galintys sukelti infekciją; naudoti juos laikantys visų saugaus darbo reikalavimų, utilizuoti remiantis rekomendacijomis galiojančiomis šio tipo pavojingoms biologinėms atliekoms.
- Reagentų sudėtyje yra gyvulinės kilmės produktų, todėl naudoti laikantys saugumo reikalavimų.
- Nenaudoti pasibaigus galiojimo laikui.
- Nenaudoti užterštų ar kitaip pažeistų reagentų.

6/ TIRIAMUJŲ MĖGINIŲ SURINKIMAS

Tyrimui naudojamos jaunos (24-48 valandų) kolonijos izoliuotos kambario temperatūroje ar 37 °C temperatūroje ant agarų, pageidautina Peri lėkštelėje. Rekomenduojama kolonijų išskyrimui naudoti mielėms specifines terpes [3].

7/ REAGENTŲ SAUGOJIMAS

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 naudojami iš karto juos atidarius.

8/ PAPILDOMOS PRIEMONĖS IR REAGENTAI

- parafino aliejus
- sterilios pipetės
- 37 °C temperatūros termostatas
- pavojingų medžiagų konteineris

9/ TYRIMO EIGA

Visi reagentai prieš naudojant turi būti kambario temperatūros (18-25 °C).

9.1 Inokuliuoto paruošimas

Kilpelę ar Pastero pipetę uždaru galu paimkite išskirtas kolonijas ir patalpinkite jas į buteliuką su Reagentu 1. Buteliuką švelniai supurtikite. Inokuliuoto *standartizaciją* galima atlikti trim skirtingais būdais:

* su drumstumo kontrole

Palyginkite paruošti inokuliuoto Reagento 1 drumstumą su ant drumstumo kontrolės buteliuko esančiom juodom juostelėm. Jei Reagentas 1 *yra skaidresnis* (nepakankamas inokuliatas), papildomai įdėkite dar kolonijų, kol drumstumas bus lygus praskiedimo drumstumo kontrolei. Jei Reagentas 1 *yra labiau drumstas* (per daug koncentruotas inokuliatas), skieskite jį su Reagentu 1 iš kito naujai atidaryto buteliuko, kol pasieksite tinkamą drumstumą.

* su densitometru

Su densitometru patikrinkite ar inokuliuoto Reagento 1 drumstumas yra lygus 1 Mac Farland. Esant poreikiui nustatykite drumstumą taip, kaip aprašyta aukščiau.

* skaičiavimas Malasezo kameroje

Standartizuoti inokuliatą galima skaičiuojant mieles Malaseze kameroje. Reikia pasiekti 2500 - 3500 mielių/ml titrą.

9.2a. CANDIFAST plokštelės inokuliuojimas

Identifikavimo eilutė: Plokštelę pažymėkite atitinkamu kodu. Nuimkite lipnią juostelę, dengiančią plokštelę ir į pirmas 8 pirmos eilės duobutes lašinkite po :

- 100 µL inokuliuoto standartizuoto Reagento 1

- 2 lašus parafino aliejaus.

Ant plokštelės uždėkite lipnią juostelę.

Atsparumo eilutė: Pirmiausia į Reagentą 2 įpilkite 100 µL standartizuoto Reagento 1 (žr. skyrelį 9.1). Po to nuimkite lipnią juostelę ir į pirmas 8 antros eilės duobutes įlašinkite po :

- 100 µL standartizuoto inokuliuoto Reagento 2

- 2 lašusparafino aliejaus.

Plokštelę vėl uždėkite lipnią juostelę.

9.2b. CANDIFAST ES TWIN plokštelės inokuliuojamas

Pirmo mėginio eilutė

Reagentą R2 inokuliuokite 100 µL standartizuoto Reagentu R1. Plokštelę pažymėkite atitinkamu kodu. Po to nuimkite lipnią juostelę ir į pirmas 8 vienos eilės duobutės įlašinkite po :

- 100 µL standartizuoto inokuliuoto Reagentu R2

- 2 lašus parafino aliejaus.

Plokštelę vėl uždenkite lipnia juoste.

Antrą mėginio eilutė

Metodologiškai taip pat inokuliuokite kitu paruoštu R2 ir antrą plokštelės eilutę. Plokštelę uždenkite lipnia juoste.

9.3. Inkubacija

Inkubuokite plokštelę 37 °C temperatūroje 24 valandas. Esant poreikiui, priklausomai nuo štamo, inkubaciją galima pratęsti 48 - 72 valandų.

Plokštelę vertinkite, kai mielės užauga kontrolinėje duobutėje (t.y. pasikeičia spalva arba/ir atsiranda drumstumas).

10/ PLOKŠTELĖS REZULTATŲ ĮVERTINIMAS IR AIŠKINIMAS

Vertinkite visą plokštelę tik tuomet, kai kontrolinė duobutė (C+ : 1 duobutė atsparumo tyrimas) yra terpės spalvinis pasikeitimas :

Spalva pasikeičia į geltoną, geltonai-oranžinę ar fuksino (ureazei teigiama)

10.1 Identifikavimo eilutė

duobutė1 (ACT) Teigiamas rezultatas, kai spalva pasikeičia į geltoną, geltonai-oranžinę ar fuksino.

Neigiamas rezultatas, kai duobutėje esanti terpė išlieka nepakeitusi spalvos į geltoną, geltonai-oranžinę ar fuksino.

Duobutės 2-8 (GLU-RAF)

Teigiamas rezultatas, kai spalva pasikeičia į geltoną, geltonai-oranžinę ar fuksino.

Neigiamas rezultatas, kai duobutėje esanti terpė išlieka nepakeitusi spalvos į geltoną, geltonai-oranžinę ar fuksino.

Mielių identifikavimo tyrimas atliekamas CANDIFAST plokštelėje bei pasitelkiant morfologinį kolonijų savybių įvertinimą.

Vertinant rezultatus pasitelkite į pagalbą lentelę, esančią žemiau arba schemą, kuri įeina į rinkinį. Taip pat gali būti panaudoti žymėjimai ant plokštelės lipnios juostelės: **pirmiausiai vertinkite aktidiono duobutę; tuomet nustatykite paskutinę teigiamą duobutę, pradėdant iš dešinės.** Svarbiausios genties pavadinimas yra nurodytas ant lipnios juostelės aktidiono-teigiamos (žemesnė eilė) arba aktidiono - neigiamos (viršutinės eilės) savybės ir angliavandenių susikirtimo vietoje.

Identifikavimo lentelė

Mielės	A	G	G	T	M	C	R	L
	C	L	A	R	A	E	A	A
	T	U	L	E	L	L	F	C
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	V	+	-	-	-
<i>Candida albicans (var stellatoidea)</i>	+	+	-	V	+	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	V	+	-	+	-	-	-	-
<i>Candida kefyr</i>	+	+	+	-	-	-	V	+
<i>Candida krusei</i>	V	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida lusitanae</i>	-	+	+	+	V	+	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	+	+	-	V	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Saccharomyces sp</i>	-	+	+	V	V	V	+	-
<i>Cryptococcus</i> ar <i>Trichosporon</i> ar <i>Rhodotorula genera</i>	V	ureazei teigiama						

Diferencijavimo eilutė : *Cryptococcus, Trichosporon, Rhodotorula* gentys diferencijuojamos morfologiškai.

- *Rhodotorula* gentį charakterizuoja oranžinės-raudonos kolonijos augančios ant Sabūro dekstrozės agarų.

- kai kurios *Cryptococcus* rūšys gali turėti raudoną pigmentą. Bet jos turi sudaryti kapsules reaguojamos su India ink reagentu.

- *Trichosporon* gentis auganti ant PCB agarų terpės išskiria pseudofidiją.

Pastaba :

- *Saccharomyces* gentyje žmonėms būdinga *Saccharomyces cerevisiae* rūšis.

- *Saccharomyces boulardii* ar *Saccharomyces cerevisiae* rūšys gali būti išskirtos žmonėms, kurie gydomi dėl mielių.

- Mikroskopuojant galima diferencijuoti dvi rūšis :

- *S. cerevisiae* - didelės, sferinės formos

- *S. boulardii* - mažesnės, kiaušinio formos ar ištętos.

Atliekant CANDIFAST tyrimą esant aktidionui gali augti kai kurios *Cryptococcus* rūšys.

10.2 Atsparumo eilutė

duobutės 2-8 (AB-FCZ)

Terpės spalvos pasikeitimas į geltoną, geltonai-oranžinę ar fuksino parodo, kad tiriamasis štamas gali augti toje duobutėje, o tai savo ruožtu reiškia, kad jis atsparus toje duobutėje esančiam priešgrybiniam preparatui. Bet jeigu duobutės turinys lieka skaidrus ir oranžinio raudonumo spalvos, tai reiškia, kad štamo augimas buvo stabdomas ir jis nėra atsparus duobutėje esančiam priešgrybiniam preparatui.

11/ KOKYBĖS KONTROLĖ

Rekomenduojama atlikti periodinę kokybės kontrolę naudojant *Candida albicans* ATCC 90029 ir *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

	Inkubavimo laikas	Laukiami rezultatai							
		A	G	G	T	M	C	R	L
		C	L	A	R	A	E	A	A
<i>C.albicans</i> ATCC 90029	24 valandos	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	48 valandos		+	+	-	-	-	-	-
		C	A	N	F	E	K	M	F
		+	B	Y	C	C	T	C	C
					T	Z	Z	Z	Z
<i>C.albicans</i> ATCC90029	24 valandos	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>C.parapsilosis</i> ATCC22019	48 valandos	+	-	-	-	-	-	-	-

12/ GALIMOS KLAIDOS

- Per didelė ar per maža paruošto inokuliuoto koncentracija.
 - Mišrių kolonijų inokuliuoto paruošimas arba kai kolonijų augimas ilgesnis nei 48 valandos.
 - Kai rezultatas plokštelėje įvertinamas nepasikeitus spalvai augimo kontrolės duobutėje.
 - Kai rezultatas neįvertinamas praėjus 24-48 valandos inkubuojant, kai fiksuojamas teigiamas augimas.
- Kai nesilaikoma tyrimo eigos.

13/ GALIMOS KLAIDOS

- Nustatant atsparumą priešgrybiniams preparatams in vitro diagnostikoje įtakos gali turėti in vivo gydymo kursas [2, 4].
- CANDIFAST tyrimas skirtas tik mikokutaninių mielių identifikavimui bei atsparumo nustatymui, bet ne mielių štamų susijusių su sisteminėmis mikozėmis.

- CANDIFAST tyrimas neleidžia vertinti : jautru-tarpinė-atsparu.
- Kai kurie štamai termiškai jautrūs štamai auga skirtingai inkubuojant 20 °C ir 37 °C temperatūrose. Tokiu atveju, mielės neaugs arba li būti sunku, jeigu iš viso įmanoma, jas identifikuoti ir įvertinti jų atsparumą tam tikriems priešgrybiniams preparatams.
- *C. lusitanae* augimas yra labia lėtas, TRE duobutė, todėl naudojant identifikacinę lentelę sunku nustatyti rūšį. Būtina žiūrėti į ant lipnios juostelės esančius ženklus.
- *C. glabrata* augimas yra labia lėtas, GAL duobutė, todėl naudojant identifikacinę lentelę sunku nustatyti rūšį. Būtina žiūrėti į ant lipnios juostelės esančius ženklus.
- Vertinant atsparumo rezultatus nereikia kreipti dėmesio į terpės drumstumą, kuris gali atsirasti inkubuojant azolinius priešgrybinius preparatus.

14/ PAGRINDINĖS CHARAKTERISTIK

Kolekciniai štamai

Tyrimams buvo panaudoti 80 štamai (31 *Candida albicans*, 17 *C. glabrata*, 11 *C. tropicalis*, 6 *C. lusitanae*, 3 *C. parapsilosis*, 2 *C. kefyr*, 2 *C. krusei*, 5 *Saccharomyces spp.*, 2 *Cryptococcus neoformans* ir 1 *Trichosporon cutaneum*). 78 štamai buvo teisingai idnetifikuoti, rezultatai atitiko 97,5% lyginant ELITech MICROBIO FUNGICHROM metod1 su Biomérieux API 32C metodu. Lygintas atsparumo tyrimas su Bio-Rad FUNGITEST ir Biomérieux ATB Fungus plokštele, atitikimas 87,4%.

Klinikiniai štamai

Buvo iširta 100 šviežių izoliuotų štamų išskirtų iš klinikinių mėginių (ligoninės) (72 *Candida albicans*, 9 *C.glabrata*, 8 *C.parapsilosis*, 5 *C.tropicalis*, 3 *C.krusei*, 1 *C.kefyr*, 1 *C.inconspicua* ir 1 *Saccharomyces spp.*). 98 štamai buvo nustatyti teisingai lyginant su Biomérieux VITEK metodu.

Atsparumo tyrimo rezultatai lyginti su Bio-Rad FUNGITEST ir Biomérieux ATB Fungus plokštelėm, atitikimas 98,5%. Neatitiko 10 tyrimų, 3 aiškios klaidos ir 7 smulkios klaidos. Neatitikim1 išryškino 4 štamai (2 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* ir 1 *C. tropicalis*) ir 3 priešgrybiniai preparatai : ekonazololis (2 R/I ir 1 R/S), ketonazololis (1 R/I ir 2 R/S) ir mikonazololis (4 R/I).

15/ ATLIKEU UTILIZAVIMAS

Atliekos turi būti utilizuotos laikantys šalyje nustatytų higieninių normų.

16/ LITERATURA

1. DUPONT B. 1987. Résistance de *Candida* aux antifongiques. Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Chap. 4, 23-26.
2. DUPOUY-CAMET J., M.-E. BOUGNOUX, I. VICENS et C. TOURTE-SCHAEFER. 1989. Intérêts et limites de l'antifongigramme. Rev. Fr. Lab. 197: 69-72.
- 3.GRILLOT R., B. LEBEAU et I. SELBMANN. 1989. Isolement et identification des levures, données récentes et perspectives. Rev. Fr. Lab. 197:24-32.
- 4.PAUGAM A.. 1996. Intérêt de l'étude *in vitro* de la sensibilité des levures aux antifongiques. Rev. Fr. Lab. 282: 157-159.
5. KOENIG H., J. WALLER et M. KREMER. 1989. Diagnostic et aspects épidémiologiques de 70 000 levures isolées en 8 ans. Rev. Fr. Lab. 197: 34-38.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du plateau
19, allée d'Athènes
83870 SIGNES (France)
Tel. 04 94 88 55 00
Fax : 04 94 88 55 22

