



## **1 - ZNACZENIE KLINICZNE**

W ostatnich latach notuje się coraz większą liczbę zakażeń grzybiczych, występujących u pacjentów w immunosupresji (9).

Przede wszystkim jest to spowodowane agresywniejszą terapią przeciwnowotworową, wyższym poziomem immunosupresji u pacjentów po przeszczepie narządów lub szpiku, stosowaniem antybiotyków o szerokim spektrum (2,3).

Wzrost liczby zakażeń jest jednocześnie związany z coraz częstszym występowaniem rzadkich dotąd gatunków patogennych drożdżaków (10), oraz z narastaniem oporności gatunków dotąd wrażliwych.

Biorąc pod uwagę powyższe aspekty, test do oznaczeń *in vitro* wrażliwości drożdżaków na preparaty przeciwgrzybicze wydaje się być wielce przydatnym (1, 4, 7, 8). FUNGITEST™ spełnia podane kryteria, jest łatwym do wykonania i interpretacji testem, który pozwala oznaczyć wrażliwość drożdżaków na preparaty przeciwgrzybicze wystandaryzowaną metodą, opracowaną na podstawie metody referencyjnej (5,6).

## **2 - ZASADA METODY**

FUNGITEST™ pozwala na badanie wzrostu grzybów w obecności 6 preparatów przeciwgrzybiczych, zastosowanych w dwóch różnych stężeniach, w zmodyfikowanym zburowanym podłożu płynnym RPMI 1640, w obecności barwnego wskaźnika redox.

O wzroście drożdżaków świadczy redukcja wskaźnika, dzięki czemu podłoże zmienia barwę z **niebieskiej** na **różową**. Jeśli wzrost badanego szczepu jest zahamowany przez preparat przeciwgrzybiczy, podłoże pozostaje niebieskie.

Zestaw w postaci mikropłytki o 16-tu studzienkach, zawiera:

- 2 studzienki kontroli wzrostu
- 12 studzienek z odwodnionymi czynnikami przeciwgrzybiczymi (6 czynników w dwóch różnych stężeniach)
- 2 studzienki kontroli ujemnej

Wartości stężeń antybiotyków ustalono na podstawie wartości MIC dla poszczególnych preparatów, uzyskanych na prototypowej mikropłytkie w tej samej procedurze, wg której wykonuje się FUNGITEST™.

Badania wstępne wykonano w dwóch referencyjnych laboratoriach; w Zakładzie Mikologii Instytutu Pasteura w Paryżu oraz w Laboratorium Immunologicznym Wydziału Farmacji w Montpellier; do testu wybrano 193 reprezentatywne szczepy odpowiadające izolowanym podczas rutynowej diagnostyki, w tym szczepy odporne na antybiotyki. W teście tym, badano wzrost szczepów w 8 rozcieńczeniach sześciu preparatów przeciwgrzybiczych, co pozwoliło oznaczyć wartości MIC dla poszczególnych antybiotyków. W oparciu o wykres częstości rozkładu oraz najnowsze dane literaturowe, wybrano stężenia leków do panelu.

Z powodu braku aktualnych międzynarodowych rekomendacji, dotyczących interpretacji wartości MIC, stężenia wybrane jako wartość graniczna (breakpoint) stanowią pewną wypadkową dostępnych danych i mogą być w przyszłości zmienione; określenie zależności pomiędzy wynikami uzyskiwanymi *in vitro* a odniesieniami klinicznymi wymaga dalszych badań.

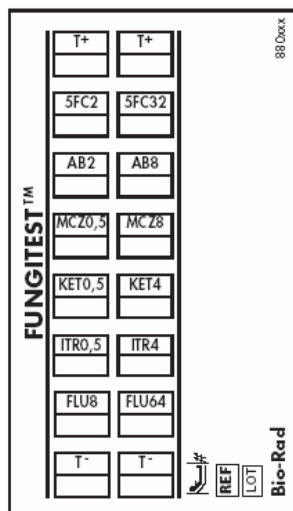
## **3 - SKŁAD ZESTAWU**

FUNGITEST™ zawiera:

- Mikropłytki: 10 indywidualnie zapakowanych mikropłytek o 16-tu studzienkach (diagram mikropłytki przedstawiono na etykiecie)
- 10 sztuk folii adhezyjnej
- Podłoże do sporządzenia zawiesiny: 10 fiolek po 3 ml podłoża gotowego do użycia podłoża do sporządzenia zawiesiny

Każda mikropłytki jest osobno zapakowana w zgrzewaną torebkę z folii aluminiowej z folią adhezyjną i pochłaniaczem wilgoci.

## Diagram mikropłytki



|                      |   |                                       |
|----------------------|---|---------------------------------------|
| <b>T<sup>+</sup></b> | ⇒ | <b>kontrola dodatnia</b>              |
| <b>5 FC</b>          | ⇒ | <b>5-fluorocytozyna (2-32 µl/ ml)</b> |
| <b>AB</b>            | ⇒ | <b>amfoterycyna B (2-8 µl/ ml)</b>    |
| <b>MCZ</b>           | ⇒ | <b>mikonazol (0.5-8 µl/ ml)</b>       |
| <b>KET</b>           | ⇒ | <b>ketokonazol (0.5-4 µl/ ml)</b>     |
| <b>ITR</b>           | ⇒ | <b>itrakonazol (0.5-4 µl/ ml)</b>     |
| <b>FLU</b>           | ⇒ | <b>flukonazol (8-64 µl/ ml)</b>       |
| <b>T<sup>-</sup></b> | ⇒ | <b>kontrola ujemna</b>                |

## 4 - PRZECZYSZCZANIE

Odczynniki, przechowywane w temperaturze +2-8°C, są trwałe zgodnie z datą ważności podaną na opakowaniu.

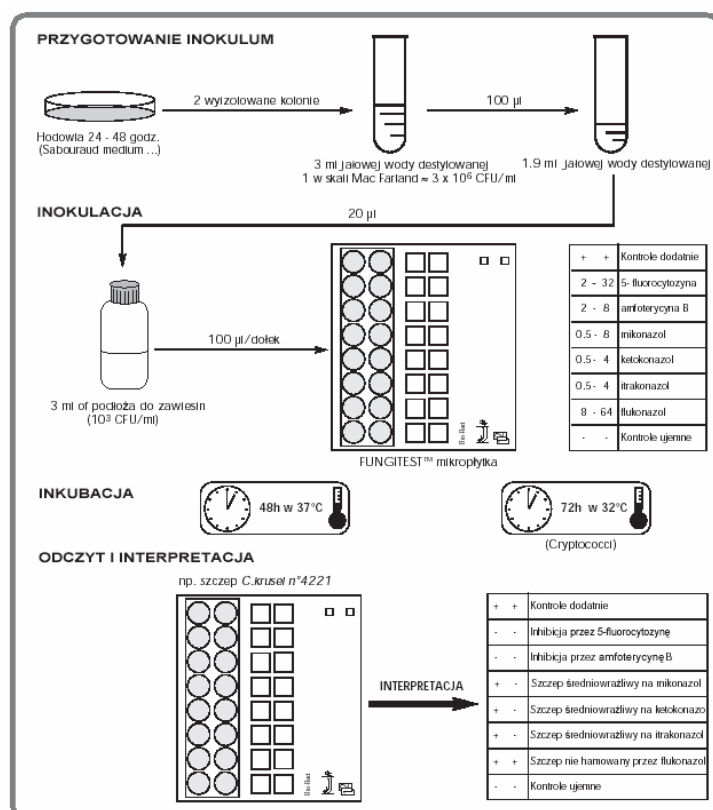
## 5 - INNE NIEZBĘDNE MATERIAŁY

- Jałowa woda destylowana
- Mikropipety pobierające 20 µl i 100 µl
- Jałowe próbówki
- Wzorzec gęstości 1 w skali McFarlanda: nr kat. 56499
- Ciepłarka o temp. 37°C i 32°C

## 6 – PROCEDURA

### A. PRZYGOTOWANIE ZAWIESINY DROŹDŹAKÓW

- Z czystej, młodej hodowli na podłożu Sabouraud z antybiotykami lub bez, pobrać dwie podobne kolonie i zawiesić w 3 ml jałowej wody destylowanej. Inokulum powinno mieć gęstość wzorca nr 1 w skali McFarlanda, co w przybliżeniu odpowiada liczbie  $3 \times 10^6$  komórek/mililitr.



- Pipetą kalibrowaną rozcieńczyć inokulum w wodzie destylowanej: 100  $\mu$ l inokulum w 1.9 ml wody.
- Pobrać 20  $\mu$ l rozcieńczonego inokulum i zaszczyć podłoże dołączone w zestawie. Liczba komórek w tej zawieszynie wynosi w przybliżeniu  $1 \times 10^3$  / mililitr.

#### B. INOKULACJA MIKROPLYTKI

- Pipetą kalibrowaną nanieść po 100  $\mu$ l zawiesiny komórek do każdej studzienki mikroplytki.
- Zakryć folią adhezyjną.

#### C. INKUBACJA MIKROPLYTKI

Inkubować:

- W temperaturze 32°C przez **72 godziny** w przypadku *Cryptococcus neoformans*
- W temperaturze 37°C przez **48 godzin** w przypadku innych drożdżaków

#### D. ODCZYT I INTERPRETACJA WYNIKÓW

- Test jest ważny tylko wtedy, gdy kontrola dodatnia (T+) ma barwę różową.
- Należy obserwować zmianę barwy w studzienkach zawierających preparaty przeciwgrzybicze w porównaniu ze studzienkami kontroli ujemnej (niebieskie).
- Wynik dla każdego preparatu uzyskuje się na podstawie interpretacji barwy w dwóch studzienkach o różnych jego stężeniach:
  - **Niebieska – Niebieska** = brak wzrostu: wzrost szczepu zahamowany przez antybiotyk *in vitro*
  - **Różowa – Niebieska** = słaby wzrost: szczep średnio-wrażliwy
  - **Różowa – Różowa** = wzrost: szczep oporny na antybiotyk *in vitro*

#### 7 – ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Nie używać odczynników po upływie terminu ważności.

#### BEZPIECZEŃSTWO I HIGIENA PRACY

Kliniczne szczepy drożdżaków i ich zawiesiny w wodzie i podłożu stanowią materiał potencjalnie zakaźny; należy obchodzić się z nimi zachowując odpowiednie środki ostrożności, przestrzegać zasad higieny, oraz eliminować w odpowiedni sposób.

## 8 - KONTROLA JAKOŚCI

Parametry jakościowe FUNGITEST™ kontrolowane są z użyciem podanych szczepów wzorcowych:

| SZCZEP                            | WYNIK PO INKUBACJI W 37°C PRZEZ 48 GODZIN |     |     |     |     |      |     |           |
|-----------------------------------|-------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----------|
|                                   | T+                                        | 5FC | AB  | MCZ | KET | ITRA | FLU | T -       |
| <i>C. tropicalis</i> ATCC 750     | Różowa                                    | S   | S/I | S/I | S   | S/I  | S   | niebieska |
| <i>C. krusei</i> ATCC 6258        | Różowa                                    | I   | S/I | I   | S/I | S/I  | I   | niebieska |
| <i>C. albicans</i> CIP 884.65     | Różowa                                    | S   | S/I | S/I | S   | S    | S   | niebieska |
| <i>C. glabrata</i> SDP A35        | Różowa                                    | S   | S   | S/I | I   | I/R  | I/R | niebieska |
| <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 | Różowa                                    | S   | S   | S/I | S   | S/I  | S   | niebieska |
| <i>C. neoformans</i> SDP B53*     | Różowa                                    | S/I | S   | S/I | S/I | S/I  | I/R | niebieska |

\* inkubacja w temp. 32°C przez 72 godziny

## 9 – KONTROLA JAKOŚCI PRODUCENTA

Wszystkie odczynniki są produkowane oraz sprzedawane zgodnie z naszym Systemem Jakości, zaczynając od otrzymania surowców do wykonania finalnego produktu. Każda seria odczynników jest poddana kontroli jakości i dopuszczona do sprzedaży po uzyskaniu określonych kryteriów. Dane dotyczące procesu produkcji oraz kontroli jakości każdej serii odczynników są archiwizowane u producenta.

## 10 - LITERATURA

1. ANAÏSSIE ELIAS J, KARYOTAKIS NICHOLAS C, HACHEM RAY, DIGNANI MARIA C., REX JOHN H., AND PAETZNICK VICTOR. Correlation between In Vitro and In Vivo Activity of Antifungal Agents against Candida Species. The Journal of Infection Diseases 1994 ; **170** : 384-389.
2. BERENGUER J, FERNANDEZ-BACA V , SANCHEZ R, BOUZA E. In Vitro Activity of Amphotericin B, Flucytosine and Fluconazole against Yeasts Causing Bloodstream Infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1995 ; **14** : 362-365.
3. DROMER F, DUPONT B. The increasing problem of fungal infections in the immunocompromised host. J. Mycol. Méd. 1996 ; **6**, Suppl. I : 1-6.
4. ESPINEL-INGROFF A, PFALLER MA. Antifungal agents and susceptibility testing. In MURRAY PR, BARON EJ, PFALLER MA, TENOVER FC, YOLKEN RH, eds. Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. Washington, DC : American Society for Microbiology, 1995.
5. ESPINEL-INGROFF A, RODRIGUEZ-TUDELA JL, and MARTINEZ-SUAREZ JV. Comparison of Two Alternative Microdilution Procedures with the National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference Macrodilution Method M27-P for In Vitro Testing of Fluconazole-Resistant and –Susceptible Isolates of *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 1995 ; **33** : 3154-3158.
6. NCCLS. Antifungal Susceptibility Testing; Committee Report. NCCLS document M27-T. NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, Pennsylvania. October 1995.
7. PAUGAM A. Intérêt de l'étude in vitro de la sensibilité des levures aux antifongiques. Revue française des laboratoires. 1996 ; **282** : 157-159.
8. PFALLER MA, BUSCHELMAN B, BALE MJ, et al. Multicenter comparison of a colorimetric microdilution broth method with the reference macrodilution method for in vitro susceptibility testing of yeast isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 1994;**19** : 9-13. 4
9. WALSH TJ, GONZALEZ C, ROILIDES E, MUELLER BU, ALI NASR, LEWIS LL, WHITCOMB TO, MARSHALL DJ, and PIZZO PA. Fungemia in Children Infected with the Human Immunodeficiency Virus : New Epidemiologic Patterns, Emerging Pathogens, and Improved Outcome with Antifungal Therapy. Clin. Infect. Dis. 1995 ; **20**: 900-906.
10. WINGARD JR. Importance of *Candida* Species Other than *C. albicans* as Pathogens in Oncology Patients. Clin. Infect. Dis. 1995 ; **20** : 115-125.

 **Bio-Rad**  
3, boulevard Raymond Poincaré  
92430 Marnes-la-Coquette France  
Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00  
Fax : +33 (0) 1 47 41 91 33

  
881060  
03/2010