

| INDEX, ÍNDICE, ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ | |
|--------------------------|--|
| 1-14 | ENGLISH |
| 15 -29 | ESPAÑOL |
| 30 -44 | ITALIANO |
| 45 -59 | DEUTSCHE |
| 60 - 74 | ΕΛΛΗΝΙΚΟ |
| 75 - 89 | FRANÇAIS |
| 90 -104 | POLSKI |
| 105 -106 | SYMBOLS SIMBOLOS SIMBOLI SYMBOL SYMBOLIS ΣΥΜΒΟΛΟ SIMBOLIS SYMBOLY |

Instructions for Use

Thermo Scientific Sensititre YeastOne Susceptibility Plates

| |
|--------------------------------|
| 029-YEAST – ROW-IVD CID9708 |
| Revision Date: June 12th, 2017 |

THERMO SCIENTIFIC SENSITITRE YEASTONE SUSCEPTIBILITY PLATES

For *in vitro* Diagnostic Use

For more information including plate layout and QC ranges, please refer to www.trekds.com/techinfo. Plate code and batch number required.

Intended Use

The Thermo Scientific™ Sensititre™ YeastOne™ susceptibility plate is an *in vitro* diagnostic microbroth dilution method in a dried 96-well microplate format that provides quantitative minimum inhibitory concentration (MIC) results for non-fastidious yeast including *Candida* species, *Cryptococcus* species, *Aspergillus* species and miscellaneous other rapid-growing yeast species.

Principles of Use

Sensititre YeastOne is a colorimetric microbroth dilution test. Each microplate is dosed with antifungal agents at appropriate dilutions and a colorimetric indicator.

Results are manually read by observing the lowest antifungal concentration that exhibits no growth (as evidenced by no color change).

Precautions

Results should be used as an aid in selecting the drug of choice for treatment.

Only trained personnel should operate the system.

Proper organism handling and disposal methods should be used.

Storage and Shelf Life

Plates should be stored at room temperature (15-25°C) away from direct sunlight and direct heat. Each plate is packaged in foil with a silica gel desiccant. Do not use the plate or broth if (1) the desiccant color is not orange, (2) the expiration date has passed, or (3) the foil pouch is damaged.

Materials

Included:

Sensititre YeastOne plate

Adhesive seal

Not Included [Product Code]:

Thermo Scientific™ Sensititre™ Demineralised Water [T3339]

Sensititre YeastOne Broth [Y3462]

Thermo Scientific™ Sensititre™ Doseheads (for use with Thermo Scientific™ Sensititre™ AIM™ Automated Inoculation Delivery System) [E3010]
Sensititre AIM System [V3020]
Thermo Scientific™ Sensititre™ Vizion™ Digital MIC Viewing System [V2021]
Thermo Scientific™ Sensititre™ Nephelometer [V3011]
Manual Viewer [V4007]
0.5 McFarland Turbidity Standard [E1041]
Bacteriological Loop
20µl Pipette
Sterile Inoculum Reservoir
100ul Pipette and Disposable Tips

Quality Control Strains

Fungal Growth Agar Plates e.g Sabauroud Dextrose Agar (SDA)
Incubator 34 - 36°C, non-CO2
Vortex Mixer

Additional Materials Required for *Aspergillus* spp. Testing

Takashio Agar or Potato Dextrose Agar
Cotton Swab
Sterile Saline with 0.05% Tween™ 20

Specimen Collection and Preparation

Specimens should be collected, transported, stored and plated onto primary isolation medium using standard procedures¹.

Selection of Susceptibility Test Broth

Sensititre System approved broths are performance tested for use with the Sensititre System.

Inoculation Procedure (*Candida* and *Cryptococcus* spp. Testing)

Allow all broths to come to room temperature before use.

Plates should be inoculated within 5 hours of removal from the pouch. A final organism density of approximately $1.5 - 8 \times 10^3$ CFU/ml is recommended.

Steps 1 and 2 should be completed within 15 minutes.

1. Pick several well isolated colonies of >1mm diameter from a pure 24-hour culture (Sabauroud Dextrose Agar) of the yeast isolate and emulsify into demineralised water. Mix well ensuring the suspension is uniform, vortex if required. If clumping occurs, allow

the suspension to settle before adjusting the density. Adjust to a 0.5 McFarland standard visually or with a Sensititre Nephelometer

2. Transfer 20 µl of the suspension into 11 ml of Sensititre YeastOne Broth to give a final inoculum of $1.5 - 8 \times 10^3$ CFU/ml.
3. Transfer 100µl of the final suspension to the Sensititre YeastOne Plate within 15 minutes of completing step 2 by either:
 - a. **Sensititre AIM System** - Replace the tube cap with a Sensititre Single-use Dosehead and inoculate the plate according to the Sensititre AIM user manual. Remove the test tube dosehead combination from the Sensititre AIM System within 30 seconds of dosing a plate and store inverted in a rack or discard
 - b. **Manual pipette** – Pour the broth into a sterile seed trough and inoculate the plate using an appropriate pipette
4. A check of the colony count should be done by removing 10µl from the positive control well and plating onto Sabauroud Dextrose Agar (SDA). A correct inoculum will produce 10-80 colonies
5. Cover all wells with the adhesive seal. Avoid creases prevent well skips

Inoculation Procedure (*Aspergillus* spp. Testing)^{5-7, 22}

Allow all broths to come to room temperature before use.

Plates should be inoculated within 5 hours of removal from the pouch.

A final organism density of approximately $0.5-5 \times 10^4$ CFU/ml is recommended.

1. Subculture from Sabouraud Dextrose Agar onto or Potato Dextrose Agar.
2. Incubate for 7 days at 35°C to obtain adequate sporulation.
3. Collect conidia with a cotton swab and suspend in sterile saline with Tween™. Allow heavy particles to settle for 3 to 5 minutes.
4. Collect supernatant and mix with a vortex mixer
5. Adjust turbidity of supernatant to 80 to 82% transmittance at 530nm measured with a spectrophotometer equivalent to an inoculum of $0.6 - 5 \times 10^6$ cfu/ml. Alternatively, adjust to a 0.5 McFarland Standard.
6. Add 100µl of the suspension to 11ml of Sensititre YeastOne broth to give a final inoculum of $0.5-5 \times 10^4$ cfu/ml.
7. Transfer 100µl of the final suspension to the Sensititre YeastOne plate within 15 minutes of completing step 2 by either:

a. Sensititre AIM System.

Replace the tube cap with a Sensititre Single-use Dosehead and inoculate the plate according to the Sensititre AIM user manual.

Remove the test tube dosehead combination from the Sensititre AIM System within 30 seconds of dosing a plate and store inverted in a rack or discard.

b. **Manual pipette.** Pour the broth into a sterile seed trough and inoculate the plate using an appropriate pipette.

8. Check the colony count by removing 10µl of the inoculum from the positive control well and plating the inoculum onto Sabauroud Dextrose Agar (SDA). A correct inoculum will produce 50-500 colonies.
9. Cover all wells with an adhesive seal. Avoid creases to prevent well skips.

Incubation

Incubate plates at 35°C in a non-CO₂ incubator.

Incubation temperatures over 35°C may affect performance.

- *Candida* species should be incubated for 24 to 25 hours (refer to step 1 under READING TEST RESULTS section)
- *Cryptococcus* species should be incubated for 72 hours.
- *Aspergillus* species should be incubated for 48 to 72 hours.

Reading Test Results

Plates may be read visually under normal laboratory lighting using a manual mirror viewer or by using the Sensititre Vizion System. Refer to the Sensititre Vizion System user manual for additional information. Yeast growth in the antifungal solutions will be evident as a change in the colorimetric growth indicator from blue (negative) to red (positive). Some yeast species may not change the indicator completely to red but display more of a purpling. Some organisms may show a slight purpling in posaconazole, voriconazole, fluconazole, itraconazole and ketoconazole.

1. Examine the positive growth well after incubation
 - a. *Candida* species should be incubated for 24 to 25 hours (refer to step 1 under READING TEST RESULTS section)
 - b. *Cryptococcus* species should be incubated for 72 hours
 - c. *Aspergillus* species should be incubated for 48 to 72 hours
2. If the growth well is red, the endpoints for the antifungals can be determined. For *Candida* species, if the well is blue or faint purple, re-incubate for an additional 24 hours and re-examine.

DO NOT READ TURBIDITY IN THE SENSITITRE YEASTONE PLATE. Read Only Color Change.

3. The MIC is the lowest concentration of an antifungal agent that substantially inhibits growth of the organism as detected by a color change.

Interpretation of Results

TABLE 1. Illustration and the interpretation of test results that may occur

| Well Concentration $\mu\text{g/ml}$ | | | | | | | R = RED: Positive growth indication B = BLUE: Negative growth indication |
|-------------------------------------|---|---|---|----|----|---|--|
| 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | | |
| A. | R | R | R | B | B | B | Typical growth pattern; MIC endpoint is 8 $\mu\text{g/ml}$. |
| B. | R | R | R | R | R | R | Growth in all wells; MIC endpoint is >32 $\mu\text{g/ml}$. |
| C. | B | B | B | B | B | B | No growth in any well; MIC endpoint is ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$. |
| D. | R | R | R | B | R | R | "Skipped Well". MIC endpoint is >32 $\mu\text{g/ml}$. Disregard "skip" when wells on either side have growth. If more than one "skip" should occur in a column, the test results are invalidated ¹ |
| E. | R | R | B | B | R | R | Double "Skipped Well". The test should be repeated ¹ |

¹With careful techniques, these occurrences are not common.

Reading Notes

Amphotericin B.

For amphotericin B at 24 hours, the endpoints are typically easily defined and the MIC is read as the lowest drug concentration that prevents any discernible color change. Trailing endpoints with Amphotericin B are not usually encountered.

The first well showing a distinct color change as compared to the positive growth well is the MIC.



Flucytosine and Azole Antifungals

Candida albicans, *C. glabrata* and *C. tropicalis* with flucytosine and azoles, such as fluconazole, itraconazole, ketoconazole, voriconazole and posaconazole may give endpoints that are

typically less sharp because of trailing growth, and may be a significant source of variability. Trailing occurs when a slight colour change persists and it is often identical for all drug concentrations above the MIC. The MIC should be read as the first well showing a less intense colour change compared to the positive growth control well. Reference strains of defined susceptibility may also help to train personnel. Isolates of *Candida krusei* are assumed to be intrinsically resistant to fluconazole and their MICs should not be interpreted, (1) a comment should accompany the test result reported.

Trailing endpoint: This occurs when a slight color change persists and is often identical in several concentrations. The MIC should be read as the first well showing a less intense color change compared to the positive growth control well.



Echinocandins

MIC end points should be determined after 24 hours of incubation at 35°C. The MIC should be read as the first well showing a less intense color change as compared to the positive control well.



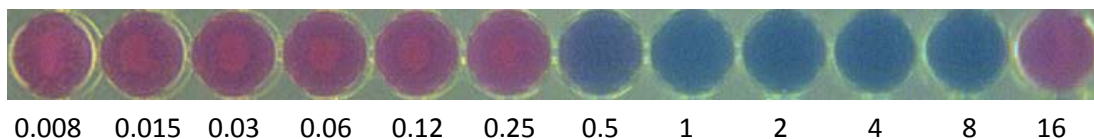
Itraconazole

Itraconazole can occasionally come out of solution at concentrations of ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$. This can result in the affected well exhibiting growth and turning red.



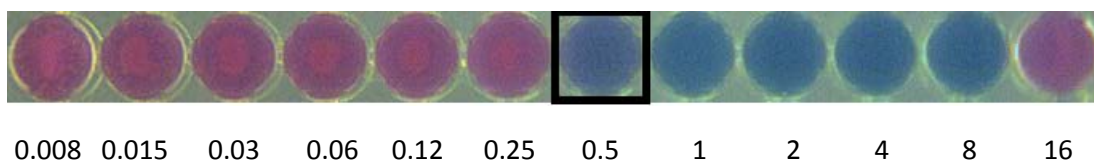
From time to time we are encountering paradoxical growth in the higher concentrations of Itraconazole on the Sensititre YeastOne Panels which results in pinking of these wells.

The paradoxical effect also known as the Eagle phenomenon refers to an observation where an increase in the antimicrobial concentration beyond a certain point paradoxically results in an increase to the number of bacteria that survive. An explanation could be that as the concentration is too high, the agent might be self-antagonising the receptor with which it binds (penicillin binding proteins, for example, in the case of a penicillin).



Resolution

The growth in the high concentration should be ignored unless you have growth in all of the other concentrations of Itraconazole. In the example below the 0.5µg/ml well highlighted with the black square is where the MIC result should be recorded.



If you have any other questions or concerns please contact the technical support department on Phone: +44 (0) 1256 694287 | Fax: +44 (0) 1256 463388 or see page 12 for list of emails.

Contamination/ Skips

Alternatively, a pink (growth) well between blue (no growth) wells could be indicative of contamination. Sub-culture well contents to ascertain the cause.

A blue well in a series of red growth wells indicates a “skip” and should be ignored. The MIC should be read above any skip wells. If there is more than one skipped well, the antifungal should not be reported.

Quality Control

Frequency of quality control testing should be conducted according to local guidelines¹

Inoculum should be cultured onto a suitable medium to check for purity. Test results are invalid if a mixed culture is detected.

All Sensititre Plates include positive control wells. Tests are invalid unless there is distinct growth in all positive control wells

The following cultures from the American Type Culture Collection (ATCC™) are recommended for user quality control:

Issatchenkia orientalis (*Candida krusei*) ATCC 6258

Candida parapsilosis ATCC 22019

Results should **not** be reported if QC results are not in range.

The inoculation, reading and interpretation of Sensititre YeastOne susceptibility plates when testing for user quality control should be performed as described on the preceding section.

Table 2. Recommended 24 and 48 hour MIC limits for two quality control strains as per Broth Microdilution CLSI M27 (Ref.2). Ranges that are different or additional to published quality control ranges are underlined.

| Antifungal Agent | <i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC6258 | | <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 | |
|------------------|--|------------|---|------------|
| | 24 hour | 48 hour | 24 hour | 48 hour |
| 5 – Flucytosine | 4-16 | 8-32 | <u>0.12-0.5</u> | 0.12-0.5 |
| Amphotericin B | 0.5-2 | 1-4 | 0.25-2 | 0.5-4 |
| Anidulafungin | 0.03-0.12 | - | 0.25-2 | - |
| Caspofungin | 0.12-1 | 0.25-1 | 0.25-1 | 0.5-4 |
| Fluconazole | 8-64 | 16-128 | 0.5-4 | <u>2-8</u> |
| Itraconazole | 0.12-1 | 0.25-1 | 0.06-0.5 | 0.12-0.5 |
| Micafungin | 0.06-0.5* | 0.12 – 0.5 | 0.5-2 | 0.5-4 |
| Posaconazole | 0.06-0.5 | 0.12-1 | 0.03-0.25 | 0.06-0.25 |
| Voriconazole | 0.06-0.5 | 0.12-1 | 0.015-0.12 | 0.03-0.25 |

* Sensititre range

Expected QC values are provided in CLSI M27; for *Aspergillus*, refer to guidance document M38.

Isolates of *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*) are assumed to be intrinsically resistant to fluconazole and their MICs should not be interpreted using this scale

NOTE 1: If minimal inhibitory concentrations (MICs) for *Candida* spp. are measured using a scale that yields results falling between categories, the next higher category is implied. Thus an isolate with a fluconazole MIC of 12.5 ug/mL would be placed in the S-DD category.

Please refer to CLSI¹ for more information concerning interpretation of results.

Limitations

1. Sensititre YeastOne Plates are for use with non-fastidious yeast including *Candida* species, *Cryptococcus* species, *Aspergillus* species and miscellaneous rapid growing yeast species. They are not intended for fastidious or slow growing yeast such as *Histoplasma* or *Blastomyces*, and filamentous fungi.
2. Comparison between the Sensititre YeastOne System at 24 hours and the CLSI reference method at 48 hour was evaluated. However due to the difficulty in correlating end points of trailing organisms (*C. albicans*) at 48 hours incubation, high error rates are observed.
3. Testing of fungi and antifungal agents is inherently less precise than testing bacteria.
4. Some investigators believe the 24-hour reading is more appropriate than the 48-hour reading because of the problem with trailing with certain isolates. The CLSI official

standard indicates that readings should be accomplished at 48 hours. Until sufficient data is collected and analyzed, the question of most clinically relevant time of reading remains unanswered. Reporting of results should indicate clearly the times of reading.

5. For additional guidance, refer to CLSI Antifungal Susceptibilities for yeast Standard M27 and for *Aspergillus* refer to M38.
6. Colour change is the indicator of the end point, not turbidity. (This fact alleviates some major concerns with the interpretation of certain *Candida* species because of 'trailing'. Trailing is more commonly seen with isolates other than those of blood and other sterile body fluids.)
7. Do not read at 24 hours if the control well has not completely turned positive.
8. The performance of Voriconazole with *Cryptococcus* species and rapid growing yeast species has not been determined. Voriconazole MIC's should therefore only be reported for *Candida* species.
9. Use only with Sensititre System approved yeast susceptibility inoculum broth. The use of other broths could result in error.
10. As with any in-vitro susceptibility testing method, the results of testing should be correlated with the patient's clinical response to prescribed therapy.
11. Performance has only been established for Amphotericin B, Itraconazole Posaconazole and Voriconazole with *Aspergillus* species.
12. Reference 5 showed high level (>99% agreement) with CLSI method for amphotericin B and *Aspergillus* species. Lower agreement was seen with Itraconazole, *A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. terreus* had >90% agreement whilst *A. nidulans* had 85% and *A. ustus* 33% on panels incubated for 48 hours with a 10^3 cfu/ml inoculum. Agreement over 90% was observed with an inoculum of 10^4 cfu/ml and 72 hours incubation with itraconazole and amphotericin B (M38).
13. Correlation of the MIC for Caspofungin to the treatment outcome following caspofungin use has not been fully established. (9)
14. Performance of the Sensititre YeastOne system with Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin with *Cryptococcus*, *Aspergillus* species and rapid growing yeast species **other than *Candida* species** has not been established. Anidulafungin, Caspofungin and Micafungin MIC's should therefore only be reported for *Candida* species.
15. Performance of the Sensititre YeastOne Plate with Posaconazole with *Cryptococcus* has not been established.
16. Only instruments supported by the Sensititre system i.e. a simple mirror viewer, , Sensititre Vizion, , must be used to report results with CE IVD and FDA cleared Sensititre products, any other system used will not be supported.

Performance

Panels read manually are designed to give comparable performance to CLSI reference microbroth procedure. Comparable performance is defined as > 90% essential and categorical agreement to within a doubling dilution of the reference MIC (1).

Bibliography

- (1) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087 (M27).
- (2) Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Messer, S.A., Knapp, C.C., Killian, S., Norris, H.A., Ghannoun M.A. (1999). Multicentre comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric Antifungal Plate with the NCCLS, M27-A Reference Method for Testing Clinical Isolates of Common and Emerging *Candida* spp., and other Yeasts and Yeast-like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**: 591-595.
- (3) Espinel-Ingroff, A., Knapp, C.C., Holliday, N., Killian, S. (2002). Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel for testing voriconazole against Isolates of *Candida* spp., a comparison with the NCCLS M27-A microdilution reference method. *Clinical Microbiology and Infection*. **8**: Suppl 1. Abstract 0125.
- (4) Davey, K.G., Szekely, A., Johnson, E.M., Warnock, D.W., (1998). Comparison of a new commercial colorimetric microdilution method with a standard method for in-vitro susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **42**: 439-444.
- (5) Meletiadiis, J., Moutin, J.W., Meis, F.G.M., Bouman, B.A., Verweij, P.E., and EuroFung Network. (2002). Comparison of the E Test and the Sensititre® Colorimetric Methods with the NCCLS, Proposed Standard for Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**: 2876-2885.
- (6) Espinel-Ingroff, A., *etal.* (1997). Multicenter Evaluation of Proposed Standardized Procedure for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**: 139-143.
- (7) Pemán, J., *etal.* (2001). Comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric method against reference M38-P for testing susceptibility of *Aspergillus* to Amphotericin B and Itraconazole. *Clinical Microbiology and Infection*, **7**: Suppl. 1. Abstract P694.
- (8) Linares, M., J., G. Charriel, F. Solís, F. Rodriguez, A. Ibarra and M. Casal. (2005) Susceptibility of filamentous fungi to voriconazole tested by two microdilution methods. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: 250-253
- (9) Kartsonis, N., *etal.* (2005). Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 3616-3623
- (10) Pfaller, M., A., *etal.* (2004) Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of five antifungal agents against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **50** :113-117

- (11) Pfaller, M, A., A. Espinel-Ingroff and R.N. Jones. (2004) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne® antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posiconazole and ravuconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 4577-4580
- (12) Espinel-Ingroff, A., *etal.* (2004) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel with the NCCLS, M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 718- 721
- (13) Linares, M, J., G. Charriel, F. Solís and M. Casal. (2004). Comparison of two microdilution methods for testing susceptibility of *Candida* spp. to voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 899-902
- (14) Espinel-Ingroff, A., M. Pfaller, S.A. Messer, C.C. Knapp, S. Killian, H.A. Norris, and M.A. Ghannoum. (1999) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other Yeasts and Yeast-Like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 591-595
- (15) Barry, A.L., M.A. Pfaller, S.D. Brown, A. Espinel-Ingroff, M.A. Ghannoum, C.c. Knapp, R.P. Rennie, J.H. Rex, and M.G. Rinaldi. (2000) Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3457-3459
- (16) Canton, E., *etal* (2005) .Sensititre YeastOne® Caspofungin susceptibility testing of *Candida* clinical isolates: Correlation with results of NCCLS, M27-A2 multicenter study . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 1604 -1607
- (17) Holliday, N.M., *etal* (2007) A reproducibility study with two echinocandins using the Sensititre YeastOne® susceptibility plate. *American Microbiology Abstract* **C-191**
- (18) Torres-Nabona, M., J. Guinea, J.Martinez_Alarcon, T. Pelaez, and E. Bouza. (2007) *In Vitro* activities of amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole against 45 clinical isolates of Zygomycetes: Comparison of NCCLS, M38-A , Sensititre YeastOne® and the Etest. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 1126 -1129
- (19) Espinel-Ingroff, A. (2006) Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing Zygomycetes, *Aspergillus* spp, *Candida* spp, and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and Amphotericin B. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 3616-3622
- (20) Patel, R., C. Mendrick, C.C. Knapp, R. Grist, and P.M. McNicholas. (2007) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne® plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posaconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2000-2001
- (21) Alexander, B. D., T.C. Byrne, K.L. Smith, K.E. Hansen, K.J. Anstrom, J.R. Perfect and L. B. Reller. (2007) Comparative evaluation of Etest and Sensititre YeastOne® panels against the Clinical Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 698-706
-

(22). Patel, R., *et al.* (2007). Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posiconazole. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**: 2000-2001

DISCLAIMER

The information provided in this technical insert is current at the time of printing and may change without notice.

The latest information can be downloaded from www.trekds.com\techinfo or by
Contacting Thermo Fisher Scientific Microbiology Technical Services.



Manufactured by TREK Diagnostic Systems (Part of Thermo Fisher Scientific Inc)
Units 17-19 Birches Industrial Estate, East Grinstead,
West Sussex. RH19 1XZ, UK.
Tel: +44- 1342-318777



The ATCC Licensed Derivative® Emblem, the ATCC Licensed Derivative® word mark, and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Thermo Fisher Scientific Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. ATCC is a trademark of ATCC. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.



Technical Support email addresses

| | |
|-----------------------------|---|
| Austria | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Belgium | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| Czech Republic | mikrobiologie.tech.podpora.cz@thermofisher.com |
| Denmark | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| France | microbiologie.techsupport.fr@thermofisher.com |
| Finland | mikrobiologia.tekninentuki.fi@thermofisher.com |
| Germany | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Italy | microbiologia.supportotecnico.it@thermofisher.com |
| Netherlands | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| Norway | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Spain | microbiologia.soporte.es@thermofisher.com |
| Sweden | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| UK Technical Support | microbiology.techsupport.uk@thermofisher.com |

Instrucciones de uso

***Placas de susceptibilidad Sensititre YeastOne de
Thermo Scientific***

| |
|--|
| 029-YEAST – ROW-IVD CID9708 |
| Fecha de revisión: 12ª de junio de 2017 |

PLACAS DE SUSCEPTIBILIDAD SENSITITRE YEASTONE DE THERMO SCIENTIFIC

Para uso diagnóstico *in vitro*

Para obtener más información, que incluya el diseño y los rangos de CC de las placas, consulte www.trekds.com/techinfo. Se necesita el código y el número de lote de las placas.

Uso previsto

La placa de susceptibilidad Sensititre™ YeastOne™ de Thermo Scientific™ es un método de disolución de diagnóstico *in vitro* en un formato de microplaca de 96 pocillos secos que proporciona resultados de concentración inhibitoria mínima (minimum inhibitory concentration, MIC) cuantitativa de hongos levaduriformes de cultivo no exigente, entre los que se incluyen el género *Candida*, el género *Cryptococcus*, el género *Aspergillus* y otros géneros variados de hongos levaduriformes de rápida proliferación.

Principios de uso

Sensititre YeastOne es una prueba de disolución colorimétrica. Cada microplaca se dosifica con agentes antifúngicos a las diluciones adecuadas y un indicador colorimétrico.

Los resultados se leen manualmente, observando la concentración fúngica menor que no presenta proliferación (tal y como se evidencia al no haber cambio de color).

Precauciones

Los resultados deben usarse como una ayuda para seleccionar el medicamento escogido para el tratamiento.

El sistema solo debe ser utilizado por personal experimentado.

Deben usarse los métodos de manipulación y eliminación de microorganismos adecuados.

Conservación y vida útil

Las placas deben conservarse a temperatura ambiente (15-25 °C) alejadas de la luz solar y el calor directos. Cada placa está envasada en papel de aluminio con un desecante de gel de sílice. No utilice una placa o caldo de cultivo si (1) el color del desecante no es naranja, (2) la fecha de caducidad ha pasado, o (3) el envoltorio de papel de aluminio está dañado.

Materiales

Incluido:

Placa Sensititre YeastOne

Sello adhesivo

No incluido [Product Code]:

Agua desmineralizada Sensititre™ de Thermo Scientific™ [T3339]

Caldo de cultivo Sensititre YeastOne [Y3462]

Cabezales de dosificación Sensititre™ de Thermo Scientific™ (para uso con el sistema de inoculación automatizada Sensititre™ AIM™ de Thermo Scientific™) [E3010]

Sistema Sensititre AIM [V3020]

Sistema digital de visualización de MIC Sensititre™ Vizion™ de Thermo Scientific™ [V2021]

Nefelómetro Sensititre™ de Thermo Scientific™ [V3011]

Visor manual [V4007]

Estándar de turbidez 0,5 de McFarland [E1041]

Asa bacteriológica

Pipeta de 20 µl

Depósito de inóculo estéril

Puntas desechables y pipeta de 100 µl

Cepas de control de calidad

Placas de agar de proliferación fúngica p. ej. agar de dextrosa de Sabauroud (Sabauroud Dextrose Agar, SDA)

Incubadora 34-36 °C, sin CO2

Agitadora vorticial

Materiales adicionales necesarios para el análisis de *Aspergillus* spp.

Agar de Takashio o agar de dextrosa de patata

Hisopo de algodón

Solución salina estéril con Tween™ 20 al 0,05 %

Obtención y preparación de muestras

Las muestras deben ser obtenidas, transportadas, conservadas y colocadas en una placa con medio de aislamiento primario mediante el procedimiento estándar¹.

Selección de caldo de cultivo para análisis de susceptibilidad

El rendimiento de los caldos de cultivo aprobados para el Sistema Sensititre ha sido comprobado de cara a usarse con el Sistema Sensititre.

Procedimiento de inoculación (Análisis de *Candida* y *Cryptococcus* spp.)

Antes de su uso, deje que todos los caldos de cultivo alcancen la temperatura ambiente.

Las placas se deben inocular en las 5 horas siguientes a la retirada del envoltorio. Se recomienda una densidad de microorganismos final de aproximadamente $1,5 - 8 \times 10^3$ UFC/ml.

Los pasos 1 y 2 deben completarse en un plazo de 15 minutos.

Elija varias colonias bien aisladas de >1 mm de diámetro de un cultivo puro de 24 horas (Agar de dextrosa de Sabauroud) del aislado de hongos levaduriformes y emulsione en agua desmineralizada. Mezclar bien. Asegurar la suspensión es uniforme, Dar un vortex si se considera necesario. Si se produce aglutinación, permita que la suspensión se asiente antes de ajustar la densidad. Ajuste a un estándar 0,5 de McFarland visualmente o con un nefelómetro Sensititre.

1. Transfiera 20 µl de la suspensión a 11 ml de caldo de cultivo Sensititre YeastOne para obtener un inóculo final de $1,5 - 8 \times 10^3$ UFC/ml.
2. Transfiera 100 µl de la suspensión final a la placa Sensititre YeastOne en un plazo de 15 minutos una vez completado el paso 2, utilizando uno de los siguientes métodos:
 - a. **Sistema Sensititre AIM:** Vuelva a colocar el tapón del tubo con un cabezal de dosificación de un solo uso Sensititre e inocule la placa de acuerdo con el manual del usuario del Sensititre AIM. Retire la combinación de tubo de análisis y cabezal de dosificación del Sistema Sensititre AIM en los 30 segundos posteriores a la dosificación de una placa y guárdela en posición invertida en una gradilla o deséchela
 - b. **Pipeta manual:** Vierta el caldo de cultivo en una siembra estéril e inocule la placa con una pipeta adecuada
3. Debe realizarse una comprobación del recuento de colonias retirando 10 µl del pocillo de control positivo y sembrándolos en una placa de agar de dextrosa de Sabauroud (SDA). Un inóculo correcto producirá 10-80 colonias
4. Cubra todos los pocillos con el sello adhesivo. Evite pliegues para prevenir saltos de pocillos

Procedimiento de inoculación (Análisis de *Aspergillus* spp.)^{5-7, 22}

Antes de su uso, deje que todos los caldos de cultivo alcancen la temperatura ambiente.

Las placas se deben inocular en las 5 horas siguientes a la retirada del envoltorio.

Se recomienda una densidad de microorganismos final de aproximadamente $0,5-5 \times 10^4$ UFC/ml.

1. Realice un subcultivo de agar de dextrosa de Sabauroud o agar de dextrosa de patata.
2. Incube durante 7 días a 35°C para obtener una esporulación adecuada.
3. Recoja conidios con un hisopo de algodón y suspenda en solución salina estéril con Tween™. Permita que las partículas pesadas se asienten durante 3 a 5 minutos.
4. Recoja el sobrenadante y mezcle con una agitadora vortical
5. Ajuste la turbidez del sobrenadante para conseguir una transmitancia del 80-82 % a 530 nm, medida con un espectrofotómetro equivalente a un inóculo de $0,6 - 5 \times 10^6$ ufc/ml. Alternativamente, ajuste a un estándar 0,5 de McFarland.

6. Añada 100 µl de la suspensión a 11 ml de caldo de cultivo Sensititre YeastOne para obtener un inóculo final de $0,5-5 \times 10^4$ ufc/ml.
7. Transfiera 100 µl de la suspensión final a la placa Sensititre YeastOne en un plazo de 15 minutos una vez completado el paso 2, utilizando uno de los siguientes métodos:

- a. **Sistema Sensititre AIM.**

Vuelva a colocar el tapón del tubo con un cabezal de dosificación de un solo uso Sensititre e inocule la placa de acuerdo con el manual del usuario del Sensititre AIM.

Retire la combinación de tubo de análisis y cabezal de dosificación del Sistema Sensititre AIM en los 30 segundos posteriores a la dosificación de una placa y guárdela en posición invertida en una gradilla o deséchela.

- b. **Pipeta manual.** Vierta el caldo de cultivo en una siemiente estéril e inocule la placa con una pipeta adecuada.

8. Compruebe el recuento de colonias retirando 10 µl del inóculo del pocillo de control positivo y sembrando el inóculo en agar de dextrosa de Sabauroud (SDA). Un inóculo correcto producirá 50-500 colonias.
9. Cubra todos los pocillos con un sello adhesivo. Evite pliegues para prevenir saltos de pocillos.

Incubación

Incube placas a 35°C en una estufa de incubación sin CO₂.

Las temperaturas de incubación superiores a 35°C pueden afectar al rendimiento.

- El género *Candida* debe incubarse durante 24 a 25 horas (consulte el paso 1 de la sección LECTURA DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS)
- El género *Cryptococcus* debe incubarse durante 72 horas.
- El género *Aspergillus* debe incubarse durante 48 a 72 horas.

Lectura de los resultados de los análisis

Las placas se pueden leer visualmente bajo una iluminación de laboratorio normal utilizando un visor de espejo manual o utilizando el Sistema Sensititre Vizion. Consulte el manual del usuario del Sistema Sensititre Vizion para obtener información adicional. La proliferación de hongos levaduriformes en las soluciones antifúngicas se hará evidente como un cambio en el indicador colorimétrico de proliferación, que pasará de azul (negativo) a rojo (positivo). Algunos géneros de hongos levaduriformes posiblemente no cambien el indicador por completo hasta el rojo, sino que mostrarán un tono más púrpura. Algunos microorganismos pueden mostrar un ligero tono púrpura en posaconazol, voriconazol, fluconazol, itraconazol y ketoconazol.

1. Examine el pocillo de proliferación positiva después de la incubación
 - a. El género *Candida* debe incubarse durante 24 a 25 horas (consulte el paso 1 de la sección LECTURA DE LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS)
 - b. El género *Cryptococcus* debe incubarse durante 72 horas
 - c. El género *Aspergillus* debe incubarse durante 48 a 72 horas

2. Si el pocillo de proliferación está rojo, se pueden determinar los puntos finales de los antifúngicos. Para el género *Candida*, si el pocillo está de color azul o púrpura débil, vuelva a incubar durante 24 horas adicionales y vuelva a examinar.

NO LEA LA TURBIDEZ EN LA PLACA SENSITITRE YEASTONE. Lea solo el cambio de color.

3. La MIC es la concentración mínima de un agente antifúngico que inhibe sustancialmente la proliferación del microorganismo, tal y como se detecta mediante un cambio de color.

Interpretación de los resultados

TABLA 1. Ilustración e interpretación de los resultados del análisis que pueden producirse

| Concentración del pocillo µg/ml | | | | | | | R = ROJO (RED): Indica proliferación positiva B = AZUL (BLUE): Indica proliferación negativa |
|---------------------------------|---|---|---|---|----|----|---|
| | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | |
| A. | R | R | R | B | B | B | Patrón de proliferación habitual; el punto final de la MIC es 8 µg/ml. |
| B. | R | R | R | R | R | R | Proliferación en todos los pocillos; el punto final de la MIC es >32 µg/ml. |
| C. | B | B | B | B | B | B | Sin proliferación en ningún pocillo; el punto final de la MIC es ≤1 µg/ml. |
| D. | R | R | R | B | R | R | «Pocillo saltado». El punto final de la MIC es >32 µg/ml. No tenga en cuenta un «salto» cuando los pocillos a ambos lados hayan proliferado. En caso de producirse más de un «salto» en una columna, esto invalida los resultados del análisis ¹ |
| E. | R | R | B | B | R | R | Doble «pocillo saltado». Se debe repetir el análisis ¹ |

¹ Con técnicas minuciosas, estas apariciones no son habituales.

Notas de lectura

Anfotericina B.

Para la anfotericina B a las 24 horas, los puntos finales se definen de forma fácil habitualmente y la MIC se lee como la concentración farmacológica mínima que impide cualquier cambio de color discernible. Habitualmente, no se encuentran puntos finales de proliferación residual (trailing) con la anfotericina B.

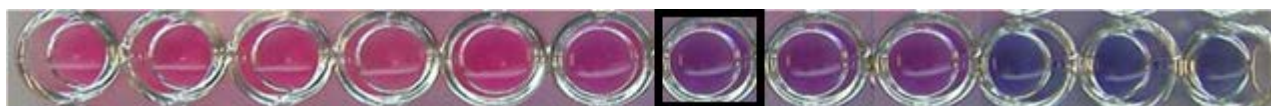
La MIC se corresponde con el primer pocillo que muestra un cambio de color evidente en comparación con el pocillo de proliferación positiva.



Antifúngicos de flucitosina y azol

Candida albicans, *C. glabrata* y *C. tropicalis* con flucitosina y azoles, tales como fluconazol, itraconazol, ketoconazol, voriconazol y posaconazol pueden dar puntos finales habitualmente menos precisos a causa de la proliferación residual (trailing) y pueden ser una fuente importante de variabilidad. La proliferación residual se produce cuando persiste un ligero cambio de color y con frecuencia es idéntico para todas las concentraciones de fármaco por encima de la MIC. La MIC debe leerse como el primer pocillo que muestra un cambio de color menos intenso en comparación con el pocillo de control de proliferación positiva. Las cepas de referencia de susceptibilidad definida también pueden ayudar a formar al personal. Se asume que los aislados de *Candida krusei* son intrínsecamente resistentes a fluconazol y sus MIC no se deben interpretar; debe adjuntarse (1) un comentario al resultado del análisis comunicado.

Punto final de proliferación residual: Se produce cuando persiste un ligero cambio de color y con frecuencia es idéntico en varias concentraciones. La MIC debe leerse como el primer pocillo que muestra un cambio de color menos intenso en comparación con el pocillo de control de proliferación positiva.



Equinocandinas

Los puntos finales de la MIC se deben determinar después de 24 horas de incubación a 35°C. La MIC debe leerse como el primer pocillo que muestre un cambio de color menos intenso en comparación con el pocillo de control positivo.



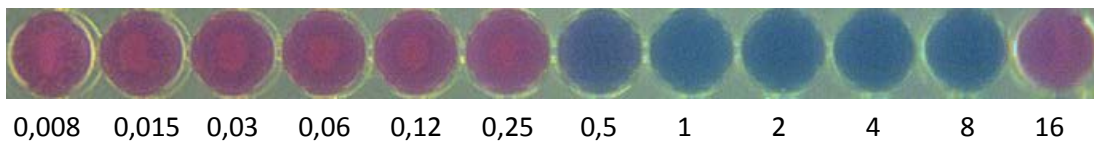
Itraconazol

El itraconazol puede aparecer, ocasionalmente, en la solución a concentraciones de $\geq 4 \mu\text{g/ml}$. Esto puede dar lugar a que el pocillo afectado muestre proliferación y se vuelva rojo.



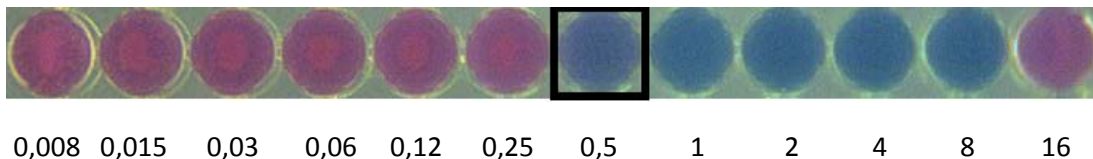
Cada cierto tiempo nos encontraremos una proliferación paradójica en las concentraciones más elevadas de itraconazol en los paneles Sensititre YeastOne, que da lugar a que esos pocillos se vuelvan rosas.

El efecto paradójico, también conocido como el fenómeno de Eagle, se refiere a una observación en la que un aumento de la concentración antimicrobiana más allá de un determinado punto, da lugar, paradójicamente, a un aumento del número de bacterias que sobreviven. Una explicación podría ser que, dado que la concentración es demasiado elevada, el agente podría estar autoantagonizando al receptor al que se liga (proteínas ligadoras de penicilina, por ejemplo, en el caso de una penicilina).



Resolución

La proliferación en la concentración alta se debe ignorar a menos que tenga proliferación en todas las demás concentraciones de itraconazol. En el siguiente ejemplo, el pocillo de 0,5 µg/ml resaltado con el cuadrado negro es el punto donde debe registrarse el resultado de la MIC.



Si tiene cualquier otra pregunta o preocupación, póngase en contacto con el departamento de asistencia técnica llamando al teléfono: +44 (0) 1256 694287 | Fax: +44 (0) 1256 463388 o consulte la página 12 para ver la lista de correos electrónicos.

Contaminación/Saltos

Alternativamente, un pocillo rosa (proliferación) entre pocillos azules (sin proliferación) podría indicar contaminación. Realice un subcultivo del contenido de los pocillos para averiguar la causa.

Un pocillo azul en una serie de pocillos de proliferación rojos, indica un «salto» y se debe ignorar. La MIC se debe leer por encima de cualquier pocillo saltado. Si hay más de un pocillo saltado, no se debe comunicar el antifúngico.

Control de calidad

La frecuencia de las pruebas de control de calidad seguirá las directrices locales¹

El inóculo debe cultivarse en un medio adecuado para comprobar su pureza. Si se detecta una mezcla de cultivos, los resultados del análisis no serán válidos.

Todas las placas Sensititre incluyen pocillos de control positivos. Los análisis no son válidos a menos que haya una proliferación clara en todos los pocillos de control positivos

Se recomiendan los siguientes cultivos de la Colección Estadounidense de Cultivos Tipo (ATCC™) para un control de calidad del usuario:

Issatchenkia orientalis (*Candida krusei*) ATCC 6258

Candida parapsilosis ATCC 22019

Los resultados **no** deben tenerse en cuenta si los resultados de control de calidad se encuentran fuera del intervalo.

La inoculación, la lectura y la interpretación de las placas de sensibilidad Sensititre YeastOne al analizar el control de calidad del usuario deberían realizarse tal y como se describe en la sección anterior.

Tabla 2. Límites CIM recomendados de 24 y 48 horas para dos cepas de control de calidad atendiendo a la microdilución en caldo CLSI M27 (ref. 2). Los intervalos diferentes o adicionales a los intervalos de control de calidad publicados se muestran subrayados.

| Agente antifúngico | <i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC 6258 | | <i>Candida krusei</i> ATCC 22019 | |
|--------------------|---|----------|-------------------------------------|-----------|
| | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas |
| 5-Flucitosina | 4-16 | 8-32 | <u>0,12-0,5</u> | 0,12-0,5 |
| Anfotericina B | 0,5-2 | 1-4 | 0,25-2 | 0,5-4 |
| Anidulafungina | 0,03-0,12 | - | 0,25-2 | - |
| Caspofungina | 0,12-1 | 0,25-1 | 0,25-1 | 0,5-4 |
| Fluconazol | 8-64 | 16-128 | 0,5-4 | 2-8 |
| Itraconazol | 0,12-1 | 0,25-1 | 0,06-0,5 | 0,12-0,5 |
| Micafungina | 0,06-0,5* | 0,12-0,5 | 0,5-2 | 0,5-4 |
| Posaconazol | 0,06-0,5 | 0,12-1 | 0,03-0,25 | 0,06-0,25 |
| Voriconazol | 0,06-0,5 | 0,12-1 | 0,015-0,12 | 0,03-0,25 |

* Sensititre los intervalos

Los valores de CC previstos se proporcionan en CLSI M27; para *Aspergillus*, consulte el documento de directrices M38.

Se asume que los aislados de *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*) son intrínsecamente resistentes a fluconazol y sus MIC no deben interpretarse usando esta escala

NOTA 1: Si las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de *Candida* spp. se miden usando una escala que ofrece resultados que caen entre categorías, se sobreentiende la siguiente categoría superior. Por tanto, un aislado con una MIC de fluconazol de 12,5 µg/ml se incluiría en la categoría S-DD.

Consulte al Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)¹ para obtener más información sobre la interpretación de los resultados.

Limitaciones

1. Las placas Sensititre YeastOne están indicadas para usarse con hongos levaduriformes de cultivo no exigente, entre los que se incluyen el género *Candida*, el género *Cryptococcus*, el género *Aspergillus* y otros géneros variados de hongos levaduriformes de rápida proliferación. No están indicadas para hongos levaduriformes de cultivo exigente o proliferación lenta como *Histoplasma* o *Blastomyces*, y hongos filamentosos.
2. Se evaluó la comparación entre el Sistema Sensititre YeastOne a las 24 horas y el método de referencia del CLSI a las 48 horas. Sin embargo, debido a la dificultad para correlacionar los puntos finales de los microorganismos de proliferación residual (*C. albicans*) a las 48 horas de incubación, se observaron tasas de error elevadas.

3. El análisis de los hongos y los agentes antifúngicos es intrínsecamente menos preciso que el análisis de las bacterias.
4. Algunos investigadores creen que la lectura a las 24 horas es más adecuada que la lectura a las 48 horas, debido al problema con la proliferación residual de determinados aislados. El estándar oficial del CLSI indica que las lecturas deben llevarse a cabo a las 48 horas. Hasta que se obtengan y analicen suficientes datos, sigue sin respuesta la cuestión del tiempo de lectura más relevante a nivel clínico. La comunicación de los resultados debe indicar claramente los tiempos de lectura.
5. Para obtener directrices adicionales, consulte las Susceptibilidades antifúngicas del CLSI; en el caso de los hongos levaduriformes el estándar M27 y en el caso de *Aspergillus* consulte el M38.
6. El cambio de color es el indicador del punto final, no la turbidez. (Este hecho, atenúa algunas preocupaciones importantes respecto a la interpretación de determinados géneros *Candida*, debido a la proliferación residual. La proliferación residual se aprecia con más frecuencia con aislados que no sean de sangre ni de otros líquidos corporales estériles).
7. No lea a las 24 horas si el pocillo de control no ha se ha puesto positivo por completo.
8. No se ha determinado el rendimiento de voriconazol con el género *Cryptococcus* ni con géneros de hongos levaduriformes de rápida proliferación. La MIC de voriconazol solo se debe comunicar, por tanto, para el género *Candida*.
9. Use solo con el caldo de cultivo de inóculo con susceptibilidad a hongos levaduriformes aprobado del Sistema Sensititre. El uso de otros caldos de cultivo podría producir errores.
10. Como ocurre con cualquier método de análisis de la susceptibilidad in vitro, los resultados del análisis se deben correlacionar con la respuesta clínica del paciente al tratamiento recetado.
11. Solo se ha establecido el rendimiento para anfotericina B, itraconazol, posaconazol y voriconazol con el género *Aspergillus*.
12. La referencia 5 mostró un alto nivel (concordancia >99 %) con el método del CLSI para anfotericina B y el género *Aspergillus*. Se apreció una concordancia inferior con itraconazol, *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. terreus* tuvieron una concordancia >90 % mientras que *A. nidulans* tuvo una concordancia del 85 % y *A. ustus* del 33 % en paneles incubados durante 48 horas con un inóculo de 10^3 ufc/ml. Se observó una concordancia superior al 90 % con un inóculo de 10^4 ufc/ml y una incubación de 72 horas con itraconazol y anfotericina B (M38).
13. No se ha establecido plenamente la correlación de la MIC de caspofungina con el resultado del tratamiento después de la utilización de caspofungina. (9)
14. No se ha establecido el rendimiento del sistema Sensititre YeastOne con anidulafungina, caspofungina, y Micafungina con *Cryptococcus*, el género *Aspergillus* y los géneros de hongos levaduriformes de rápida proliferación **distintos del género *Candida***. Las MIC de anidulafungina, caspofungina y micafungina solo se deben comunicar, por tanto, para el género *Candida*.
15. No se ha establecido el rendimiento de la Placa Sensititre YeastOne con posaconazol con *Cryptococcus*.
16. Solo deben usarse instrumentos compatibles con el sistema Sensititre p. ej. un visor de espejo simple, Sensititre Vizion, para comunicar resultados con productos Sensititre autorizados por el marcado CE IVD y la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA) de EE. UU., cualquier otro sistema no será compatible.

Rendimiento

Los paneles que se leen manualmente están diseñados para ofrecer un rendimiento comparable con el procedimiento de microcaldo de referencia del CLSI. El rendimiento comparable se define como una concordancia esencial y categórica $\geq 90\%$ en una dilución doble de la CMI de referencia (1).

Bibliografía

- (1) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087 (M27).
- (2) Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Messer, S.A., Knapp, C.C., Killian, S., Norris, H.A., Ghannoun M.A. (1999). Multicentre comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric Antifungal Plate with the NCCLS, M27-A Reference Method for Testing Clinical Isolates of Common and Emerging *Candida* spp., and other Yeasts and Yeast-like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**: 591-595.
- (3) Espinel-Ingroff, A., Knapp, C.C., Holliday, N., Killian, S. (2002). Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel for testing voriconazole against Isolates of *Candida* spp., a comparison with the NCCLS M27-A microdilution reference method. *Clinical Microbiology and Infection*. **8**: Suppl 1. Abstract 0125.
- (4) Davey, K.G., Szekely, A., Johnson, E.M., Warnock, D.W., (1998). Comparison of a new commercial colorimetric microdilution method with a standard method for in-vitro susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **42**: 439-444.
- (5) Meletiadis, J., Moutin, J.W., Meis, F.G.M., Bouman, B.A., Verweij, P.E., and EuroFung Network. (2002). Comparison of the E Test and the Sensititre® Colorimetric Methods with the NCCLS, Proposed Standard for Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**: 2876-2885.
- (6) Espinel-Ingroff, A., *et al.* (1997). Multicenter Evaluation of Proposed Standardized Procedure for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**: 139-143.
- (7) Pemán, J., *et al.* (2001). Comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric method against reference M38-P for testing susceptibility of *Aspergillus* to Amphotericin B and Itraconazole. *Clinical Microbiology and Infection*, **7**: Suppl. 1. Abstract P694.
- (8) Linares, M., J., G. Charriel, F. Solís, F. Rodríguez, A. Ibarra and M. Casal. (2005) Susceptibility of filamentous fungi to voriconazole tested by two microdilution methods. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: 250-253

- (9) Kartsonis, N., et al. (2005). Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 3616-3623
- (10) Pfaller, M, A., et al. (2004) Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of five antifungal agents against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **50** :113-117
- (11) Pfaller, M, A., A. Espinel-Ingroff and R.N. Jones. (2004) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne® antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posiconazole and ravuconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 4577-4580
- (12) Espinel-Ingroff, A., et al. (2004) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel with the NCCLS, M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 718- 721
- (13) Linares, M, J., G. Charriel, F. Solís and M. Casal. (2004). Comparison of two microdilution methods for testing susceptibility of *Candida* spp. to voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 899-902
- (14) Espinel-Ingroff, A., M. Pfaller, S.A. Messer, C.C. Knapp, S. Killian, H.A. Norris, and M.A. Ghannoum. (1999) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other Yeasts and Yeast-Like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 591-595
- (15) Barry, A.L., M.A. Pfaller, S.D. Brown, A. Espinel-Ingroff, M.A. Ghannoum, C.c. Knapp, R.P. Rennie, J.H. Rex, and M.G. Rinaldi. (2000) Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3457-3459
- (16) Canton, E., et al (2005) .Sensititre YeastOne® Caspofungin susceptibility testing of *Candida* clinical isolates: Correlation with results of NCCLS, M27-A2 multicenter study . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 1604 -1607
- (17) Holliday, N.M., et al (2007) A reproducibility study with two echinocandins using the Sensititre YeastOne® susceptibility plate. *American Microbiology Abstract* **C-191**
- (18) Torres-Nabona, M., J. Guinea, J.Martinez_Alarcon, T. Pelaez, and E. Bouza. (2007) *In Vitro* activities of amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole against 45 clinical isolates of Zygomycetes: Comparison of NCCLS, M38-A , Sensititre YeastOne® and the Etest. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 1126 -1129
- (19) Espinel-Ingroff, A. (2006) Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing Zygomycetes, *Aspergillus* spp, *Candida* spp, and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and Amphotericin B. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 3616-3622

(20) Patel, R., C. Mendrick, C.C. Knapp, R. Grist, and P.M. McNicholas. (2007) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne® plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posaconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2000-2001

(21) Alexander, B. D., T.C. Byrne, K.L. Smith, K.E. Hansen, K.J. Anstrom, J.R. Perfect and L. B. Reller. (2007) Comparative evaluation of Etest and Sensititre YeastOne® panels against the Clinical Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 698-706

(22). Patel, R., *etal.* (2007). Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posiconazole. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**: 2000-2001


EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD

La información proporcionada en este documento técnico está actualizada en el momento de la impresión y puede cambiar sin previo aviso.

La información más reciente puede descargarse en www.trekds.com\techinfo o por Contacto con los Servicios Técnicos de Microbiología de Thermo Fisher Scientific.



Fabricado por TREK Diagnostic Systems (Parte de Thermo Fisher Scientific Inc)
Units 17-19 Birches Industrial Estate, East Grinstead,
West Sussex. RH19 1XZ, Reino Unido.
Tel.: +44- 1342-318777

 El emblema ATCC Licensed Derivative®, la marca ATCC Licensed Derivative® y las marcas de catálogo ATCC son marcas comerciales de ATCC. Thermo Fisher Scientific Inc. está autorizada a usar estas marcas y a vender productos provenientes de los cultivos de ATCC®.

© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. Reservados todos los derechos. ATCC es una marca comercial de ATCC. Todas las demás marcas comerciales son propiedad de Thermo Fisher Scientific Inc. y sus filiales.



Direcciones de correo electrónico del servicio de asistencia técnica

| | |
|---|---|
| Austria | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Bélgica | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| República Checa | mikrobiologie.tech.podpora.cz@thermofisher.com |
| Dinamarca | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Francia | microbiologie.techsupport.fr@thermofisher.com |
| Finlandia | mikrobiologia.tekninentuki.fi@thermofisher.com |
| Alemania | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Italia | microbiologia.supportotecnico.it@thermofisher.com |
| Países Bajos | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| Noruega | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| España | microbiologia.soporte.es@thermofisher.com |
| Suecia | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Servicio de asistencia técnica del Reino Unido | microbiology.techsupport.uk@thermofisher.com |

Istruzioni per l'uso

*Piastre per test di sensibilità Sensititre YeastOne di
Thermo Scientific*

| |
|---------------------------------------|
| 029-YEAST – ROW-IVD CID9708 |
| Data revisione: 12 Giugno 2017 |

PIASTRE PER TEST DI SENSIBILITÀ SENSITITRE YEASTONE DI THERMO SCIENTIFIC

Per uso diagnostico *in vitro*

Per maggiori informazioni, inclusi il formato delle piastre e gli intervalli QC, consultare il sito www.trekds.com/techinfo. Saranno richiesti il codice della piastra e il numero di lotto.

Uso previsto

La piastra per test di sensibilità Sensititre™ YeastOne™ di Thermo Scientific™ è un metodo diagnostico *in vitro* di microdiluizione in brodo in formato disidratato su una micropiastra a 96 pozzetti che fornisce risultati quantitativi sulla concentrazione minima inibente (MIC) per lieviti non esigenti comprese le specie di *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* e altre varie specie di lieviti a crescita rapida.

Principi di utilizzo

Sensititre YeastOne è un test colorimetrico di microdiluizione in brodo. Ciascuna micropiastra è dosata con agenti antifungini nelle diluizioni adeguate e con un indicatore colorimetrico.

I risultati vengono letti manualmente osservando la concentrazione più bassa di antifungino che presenti un'assenza di crescita (come indicato dall'assenza di variazione di colore).

Precauzioni

I risultati devono essere utilizzati per facilitare la scelta del farmaco d'elezione per il trattamento. Il sistema dovrà essere utilizzato unicamente da personale che abbia ricevuto la necessaria formazione.

È necessario adottare metodi adeguati di manipolazione e smaltimento degli organismi.

Conservazione e durata

Le piastre devono essere conservate a temperatura ambiente (15-25 °C) al riparo dal calore e dalla luce solare diretta. Ciascuna piastra è confezionata in sacchetti in foglio di alluminio contenenti un essiccante (gel di silice). Non utilizzare la piastra o il brodo se (1) il colore dell'essiccante non è arancione, (2) la data di scadenza è stata superata o (3) il sacchetto in foglio di alluminio è danneggiato.

Materiali

Inclusi:

Piastra YeastOne Sensititre

Pellicola adesiva

Non inclusi [codice prodotto]:

Acqua demineralizzata Sensititre™ di Thermo Scientific™ [T3339]

Brodo Sensititre YeastOne [Y3462]

Tappi dosatori Sensititre™ di Thermo Scientific™ (da utilizzare con il sistema di distribuzione automatica dell'inoculo Sensititre™ AIM™ di Thermo Scientific™) [E3010]

Sistema Sensititre AIM [V3020]

Sistema di visualizzazione digitale della MIC Sensititre™ Vizion™ di Thermo Scientific™ [V2021]

Nefelometro Sensititre™ di Thermo Scientific™ [V3011]

Visualizzatore manuale [V4007]

Standard di torbidità McFarland 0,5 [E1041]

Ansa batteriologica

Pipetta da 20 µl

Contenitore sterile per l'inoculo

Pipetta da 100 µl e puntali monouso

Ceppi di controllo qualità

Piastre di terreno di coltura agar per funghi, ad esempio agar destrosio Sabauroud (SDA)

Incubatore a 34 - 36 °C, non-CO2

Agitatore Vortex

Materiali supplementari necessari solo per il test delle *Aspergillus* spp.

Agar Takashio o agar patata destrosio

Tampone in cotone

Soluzione salina sterile con 0,05% di Tween™ 20

Raccolta e preparazione dei campioni

I campioni devono essere raccolti, trasportati, conservati e quindi piastrati su un terreno di isolamento primario utilizzando procedure standard¹.

Selezione del brodo per il test di sensibilità

I brodi approvati per il sistema Sensititre sono testati sulle prestazioni per essere utilizzati con il sistema Sensititre.

Procedura di inoculazione (test delle *Candida* e *Cryptococcus* spp.)

Prima dell'utilizzo è necessario che tutti i brodi abbiano raggiunto la temperatura ambiente.

Le piastre devono essere inoculate entro 5 ore dalla rimozione dal sacchetto. Si consiglia una densità finale degli organismi di circa $1,5 - 8 \times 10^3$ CFU/ml.

Le fasi 1 e 2 devono essere completate entro 15 minuti.

Prelevare alcune colonie ben isolate di diametro > 1 mm da una coltura pura di 24 ore (agar destrosio Sabauroud) dell'isolato di lievito ed emulsionarle in acqua demineralizzata. Mescolare bene per garantire che la sospensione sia uniforme. Vortexare se necessario. In caso di agglutinazione, lasciar stabilizzare la sospensione prima di regolare la densità. Aggiustare a uno standard McFarland 0,5 visivamente o utilizzando un nefelometro Sensititre:

1. Trasferire 20 µl della sospensione in 11 ml di brodo Sensititre YeastOne per ottenere un inoculo finale di $1,5 - 8 \times 10^3$ CFU/ml.
2. Trasferire 100 µl della sospensione finale nella piastra Sensititre YeastOne entro 15 minuti dal completamento della fase 2 tramite:
 - a. **Sistema Sensititre AIM** - Sostituire il tappo della provetta con un tappo dosatore Sensititre monouso e inoculare la piastra secondo il manuale d'uso del Sensititre AIM. Rimuovere il gruppo provetta/tappo dosatore dal sistema Sensititre AIM entro 30 secondi dal dosaggio di una piastra e posizionarlo in posizione capovolta in una griglia o eliminare
 - b. **Pipetta manuale** - Versare il brodo in un contenitore sterile e inoculare la piastra utilizzando una pipetta adeguata
3. Per effettuare un controllo della conta delle colonie, rimuovere 10 µl dal pozzetto di controllo positivo e piastrare su agar destrosio Sabauroud (SDA). Se l'inoculo è corretto si otterranno 10-80 colonie
4. Coprire tutti i pozzetti con la pellicola adesiva. Evitare la formazione di pieghe che potrebbero lasciar scoperti alcuni pozzetti

Procedura di inoculazione (test delle *Aspergillus* spp.)^{5-7, 22}

Prima dell'utilizzo è necessario che tutti i brodi abbiano raggiunto la temperatura ambiente.

Le piastre devono essere inoculate entro 5 ore dalla rimozione dal sacchetto.

Si consiglia una densità finale degli organismi di circa $0,5 - 5 \times 10^4$ CFU/ml.

1. Fare una subcultura da agar destrosio Sabouraud in agar patata destrosio.
2. Incubare per 7 giorni a 35 °C per ottenere una sporulazione adeguata.
3. Raccogliere i conidi con un tampone in cotone e sospenderli in soluzione salina sterile con Tween™. Lasciar sedimentare le particelle pesanti per 3-5 minuti.
4. Raccogliere il sopranatante e miscelare con un agitatore Vortex
5. Aggiustare la torbidità del sopranatante a 80-82% di trasmittanza a 530 nm misurata con uno spettrofotometro equivalente ad un inoculo di $0,6 - 5 \times 10^6$ cfu/ml. In alternativa, regolare a uno standard McFarland 0,5.
6. Trasferire 100 µl della sospensione in 11 ml di brodo Sensititre YeastOne per ottenere un inoculo finale di $0,5-5 \times 10^4$ cfu/ml.
7. Trasferire 100 µl della sospensione finale nella piastra Sensititre YeastOne entro 15 minuti dal completamento della fase 2 tramite:

a. Sistema Sensititre AIM.

Sostituire il tappo della provetta con un tappo dosatore Sensititre monouso e inoculare la piastra secondo il manuale d'uso del Sensititre AIM.

Rimuovere il gruppo provetta/tappo dosatore dal sistema Sensititre AIM entro 30 secondi dal dosaggio di una piastra e posizionarlo in posizione capovolta in una griglia o eliminare.

b. **Pipetta manuale.** Versare il brodo in un contenitore sterile e inoculare la piastra utilizzando una pipetta adeguata.

8. Per effettuare un controllo della conta delle colonie, rimuovere 10 µl dal pozzetto di controllo positivo e piastrare l'inoculo su agar destrosio Sabauroud (SDA). Se l'inoculo è corretto si otterranno 50-500 colonie.
9. Coprire tutti i pozzetti con la pellicola adesiva. Evitare la formazione di pieghe che potrebbero lasciar scoperti alcuni pozzetti.

Incubazione

Incubare le piastre a 35°C in un incubatore non-CO₂.

L'incubazione a temperature superiori a 35°C può compromettere le prestazioni delle piastre.

- Le specie di *Candida* devono essere incubate per 24 - 25 ore (vedere il punto 1 nella sezione LETTURA DEI RISULTATI DEL TEST)
- Le specie di *Cryptococcus* devono essere incubate per 72 ore.
- Le specie di *Aspergillus* devono essere incubate per 48 - 72 ore.

Letture dei risultati del test

Le piastre possono essere lette visivamente in normali condizioni di illuminazione in laboratorio utilizzando un visualizzatore manuale a specchio o con l'impiego del sistema Sensititre Vision. Per maggiori informazioni, fare riferimento al manuale d'uso del sistema Sensititre Vision. La crescita dei lieviti nelle soluzioni antifungine si evidenzierà con il cambiamento dell'indicatore colorimetrico di crescita da blu (negativo) a rosso (positivo). Con alcune specie di lieviti l'indicatore potrebbe non diventare completamente rosso ma di un colore violaceo. Alcuni organismi potrebbero presentare un lieve colore violaceo per posaconazolo, voriconazolo, fluconazolo, itraconazolo e ketoconazolo.

1. Esaminare il pozzetto di controllo della crescita positivo dopo l'incubazione
 - a. Le specie di *Candida* devono essere incubate per 24 - 25 ore (vedere il punto 1 nella sezione LETTURA DEI RISULTATI DEL TEST)
 - b. Le specie di *Cryptococcus* devono essere incubate per 72 ore
 - c. Le specie di *Aspergillus* devono essere incubate per 48 - 72 ore
2. Se il pozzetto di controllo della crescita è rosso, è possibile determinare gli endpoint degli antifungini. Per le specie di *Candida*, se il pozzetto è blu o leggermente violaceo, incubare nuovamente per altre 24 ore e riesaminare.

NON LEGGERE LA TORBIDITÀ NELLE PIASTRE SENSITIVE YEASTONE. Leggere solo la variazione di colore.

3. La MIC è la più bassa concentrazione di un agente antifungino che inibisce sostanzialmente la crescita dell'organismo, come evidenziato da una variazione di colore.

Interpretazione dei risultati

TABELLA 1. Illustrazione e interpretazione dei possibili risultati del test

| Concentrazione del pozzetto in µg/ml | | | | | | | R = ROSSO: positivo, indicazione di crescita |
|--------------------------------------|---|---|---|---|----|----|--|
| | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | B = BLU: negativo, indicazione di assenza di crescita |
| A. | R | R | R | B | B | B | Schema tipico di crescita; endpoint della MIC pari a 8 µg/ml. |
| B. | R | R | R | R | R | R | Crescita in tutti i pozzetti; endpoint della MIC >32 µg/ml. |
| C. | B | B | B | B | B | B | Assenza di crescita in tutti pozzetti; endpoint della MIC ≤1 µg/ml. |
| D. | R | R | R | B | R | R | “Salto di un pozzetto”. Endpoint della MIC >32 µg/ml. Ignorare il “salto” quando i pozzetti su ambo i lati presentano crescita. Se in una colonna si verifica più di un “salto”, i risultati del test non sono validi ¹ |
| E. | R | R | B | B | R | R | Doppio “salto di pozzetto”. È necessario ripetere il test ¹ |

¹Con tecniche accurate questi eventi sono rari.

Note sulla lettura

Amfotericina B.

Per l'amfotericina B a 24 ore, gli endpoint vengono in genere definiti con facilità e la MIC corrisponde alla più bassa concentrazione di farmaco che previene qualsiasi variazione di colore distinguibile. Di solito non si riscontrano endpoint con il fenomeno del trailing per l'amfotericina B.

Il primo pozzetto che mostra una variazione definita di colore rispetto al pozzetto di crescita positiva corrisponde alla MIC.



Flucitosina e antifungini azolici

Candida albicans, *C. glabrata* e *C. tropicalis* con flucitosina e azoli, quali fluconazolo, itraconazolo, ketoconazolo, voriconazolo e posaconazolo possono dare endpoint meno netti a causa del fenomeno di inibizione della crescita (trailing) tali da rappresentare un'importante fonte di variabilità. Il trailing si verifica quando persiste una leggera variazione di colore ed è spesso identico per tutte le concentrazioni di farmaco superiori alla MIC. La MIC deve essere letta in corrispondenza del primo pozzetto che mostra una variazione di colore meno intensa rispetto al pozzetto con il controllo di crescita positivo. Ceppi di riferimento di sensibilità definita possono essere utili per l'addestramento del personale. Si suppone che isolati di *Candida krusei* siano intrinsecamente resistenti al fluconazolo e che le loro MIC non debbano essere interpretate, (1) in questo caso un commento dovrebbe accompagnare il referto contenente i risultati.

Endpoint con fenomeno di trailing: si verifica quando una lieve variazione di colore persiste ed è spesso identica in varie concentrazioni. La MIC deve essere letta in corrispondenza del primo pozzetto che mostra una variazione di colore meno intensa rispetto al pozzetto con il controllo di crescita positivo.



Echinocandine

Gli endpoint della MIC devono essere determinati dopo 24 ore di incubazione a 35 °C. La MIC deve essere letta in corrispondenza del primo pozzetto che mostra una variazione di colore meno intensa rispetto al pozzetto con il controllo positivo.



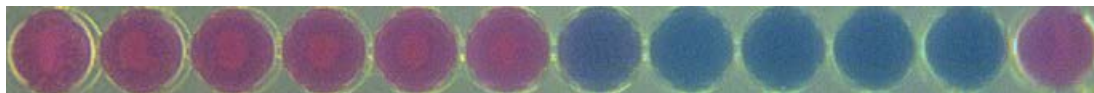
Itraconazolo

L'itraconazolo può talvolta separarsi dalla soluzione a concentrazioni ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$. In questi casi il pozzetto interessato può mostrare una crescita e diventare rosso.



Di quando in quando viene riscontrata una crescita paradossa nelle concentrazioni più elevate di itraconazolo su pannelli Sensititre YeastOne, il che comporta la colorazione di rosa di questi pozzetti.

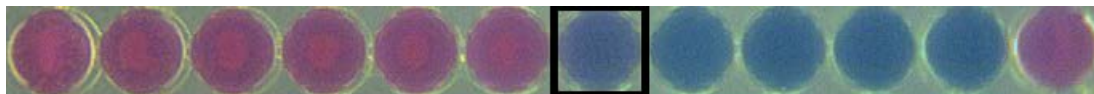
L'effetto paradosso, noto anche come fenomeno di Eagle, si riferisce ad un'osservazione in cui un aumento della concentrazione antimicrobica oltre un determinato punto comporta, in maniera paradossa, un aumento dei batteri in grado di sopravvivere. Questo potrebbe essere dovuto alla concentrazione troppo elevata che induce l'agente ad auto-antagonizzare il recettore con il quale lega (proteine leganti la penicillina, ad esempio, nel caso della penicillina).



0,008 0,015 0,03 0,06 0,12 0,25 0,5 1 2 4 8 16

Risoluzione

La crescita nella concentrazione elevata deve essere ignorata a meno che non vi sia una crescita in tutte le altre concentrazioni di itraconazolo. Nell'esempio seguente il pozzetto da 0,5 $\mu\text{g/ml}$ evidenziato con il quadrato nero si trova dove dovrebbe essere registrato il risultato MIC.



0,008 0,015 0,03 0,06 0,12 0,25 0,5 1 2 4 8 16

In caso di altre domande o dubbi, contattare l'ufficio di assistenza tecnica al numero telefonico: +44 (0) 1256 694287, al numero di fax: +44 (0) 1256 463388 oppure vedere pagina 12 per l'elenco di indirizzi e-mail.

Contaminazione / “Salti”

In alternativa, un pozzetto rosa (crescita) tra pozzetti blu (assenza di crescita) può essere indicativo di contaminazione. Sottoporre il contenuto del pozzetto a subcultura per stabilire la causa.

Un pozzetto blu in una serie di pozzetti rossi di crescita indica un “salto” e deve essere ignorato. Per la lettura della MIC dovranno essere omessi tutti i pozzetti saltati. Se è stato saltato più di un pozzetto, i risultati per gli antifungini non devono essere refertati.

Controllo qualità

La frequenza dei test di controllo qualità deve essere conforme alle linee di guida locali¹

L'inoculo deve essere messo in coltura su un terreno adeguato per controllarne la purezza. Se si rileva una coltura mista, i risultati del test sono invalidati.

Tutte le piastre Sensititre includono pozzetti di controllo positivo. I test non sono validi se non si osserva una crescita evidente in tutti i pozzetti di controllo positivo

Per il controllo di qualità dell'utente, si consigliano le seguenti colture dell'American Type Culture Collection (ATCC™):

Issatchenkia orientalis (*Candida krusei*) ATCC 6258

Candida parapsilosis ATCC 22019

I risultati **non** devono essere refertati, se i valori QC non rientrano nel range.

I valori QC previsti sono forniti nel CLSI M27; per l'*Aspergillus*, consultare il documento guida M38.

L'inoculo, la lettura e l'interpretazione delle piastre Sensititre YeastOne per la determinazione della sensibilità durante il test del controllo qualità devono essere eseguite come descritto nella sezione precedente.

Tabella 2. Limiti MIC consigliati di 24 e 48 ore per due ceppi di controllo qualità secondo le raccomandazioni CLSI M27 per microdiluizione in brodo (Rif. 2). Gli intervalli diversi o aggiuntivi rispetto agli intervalli di controllo qualità pubblicati sono sottolineati.

| Agente antifungino | Issatchenkia orientalis ATCC 6258 | | Candida parapsilopsis ATCC 22019 | |
|--------------------|--------------------------------------|----------|-------------------------------------|-----------|
| | 24 ore | 48 ore | 24 ore | 48 ore |
| 5 - Flucitosina | 4-16 | 8-32 | <u>0,12-0,5</u> | 0,12-0,5 |
| Amfotericina B | 0,5-2 | 1-4 | 0,25-2 | 0,5-4 |
| Anidulafungina | 0,03-0,12 | - | 0,25-2 | - |
| Caspofungina | 0,12-1 | 0,25-1 | 0,25-1 | 0,5-4 |
| Fluconazolo | 8-64 | 16-128 | 0,5-4 | 2-8 |
| Itraconazolo | 0,12-1 | 0,25-1 | 0,06-0,5 | 0,12-0,5 |
| Micafungin | 0,06-0,5* | 0,12-0,5 | 0,5-2 | 0,5-4 |
| Posaconazolo | 0,06-0,5 | 0,12-1 | 0,03-0,25 | 0,06-0,25 |
| Voriconazolo | 0,06-0,5 | 0,12-1 | 0,015-0,12 | 0,03-0,25 |

* Intervalli di concentrazione Sensititre

Si presume che gli isolati di *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*) siano intrinsecamente resistenti al fluconazolo e che le relative MIC non debbano essere interpretate utilizzando questa scala

NOTA 1: Se si misurano concentrazioni minime inibenti (MIC) per le *Candida* spp. utilizzando una scala che fornisce risultati rientranti fra due categorie, viene considerata la categoria immediatamente superiore. Pertanto, un isolato con una MIC di fluconazolo pari a 12,5 µg/ml sarà collocato nella categoria S-DD.

Per ulteriori informazioni sull'interpretazione dei risultati fare riferimento al CLSI¹.

Limiti

1. Le piastre Sensititre YeastOne sono destinate all'uso con lieviti non esigenti tra cui specie di *Candida*, di *Cryptococcus*, di *Aspergillus* e varie specie di lieviti a crescita rapida. Non devono essere utilizzate per lieviti esigenti o a crescita lenta quali *Histoplasma* o *Blastomyces* e funghi filamentosi.
2. È stato valutato il confronto tra il sistema YeastOne Sensititre a 24 ore e il metodo di riferimento CLSI a 48 ore. Tuttavia, a causa della difficoltà nel correlare gli endpoint degli organismi caratterizzati dal fenomeno del trailing (*C. albicans*) dopo un'incubazione di 48 ore, sono stati osservati tassi di errore notevoli.
3. I test su funghi e agenti antifungini sono, per loro stessa natura, meno precisi dei test sui batteri.
4. Alcuni ricercatori ritengono che la lettura a 24 ore sia più idonea della lettura a 48 ore a causa del fenomeno del trailing di alcuni isolati. Lo standard ufficiale CLSI indica che le

letture devono essere effettuate a 48 ore. Fino a quando non sarà stata raccolta e analizzata una quantità sufficiente di dati, la domanda su quale tempo di lettura sia più pertinente dal punto di vista clinico rimarrà senza risposta. I referti dei risultati devono indicare chiaramente i tempi di lettura.

5. Per maggiori indicazioni sulla sensibilità agli antifungini, consultare gli standard CLSI M27 per i lieviti e M38 per l'*Aspergillus*.
6. L'indicatore dell'endpoint è la variazione di colore, non la torbidità. (Questo mitiga in parte le gravi preoccupazioni sull'interpretazione di alcune specie di *Candida* a causa del fenomeno del trailing. Il trailing si verifica più comunemente con isolati diversi da quelli del sangue e di altri fluidi corporei sterili).
7. Non effettuare la lettura a 24 ore se il pozzetto di controllo non è diventato completamente positivo.
8. Le prestazioni del voriconazolo con specie di *Cryptococcus* e specie di lieviti a crescita rapida non sono state determinate. Pertanto, la MIC del voriconazolo deve essere indicata solo per le specie di *Candida*.
9. Utilizzare solo con brodo di inoculo per sensibilità dei lieviti approvato per il sistema Sensititre. L'uso di altri brodi può causare errori.
10. Come per qualsiasi altro test di sensibilità in vitro, i risultati devono essere correlati alla risposta clinica del paziente alla terapia prescritta.
11. Le prestazioni sono state stabilite solo per amfotericina B, itraconazolo, posaconazolo e voriconazolo con specie di *Aspergillus*.
12. Il riferimento bibliografico 5 ha indicato un livello elevato di concordanza (>99%) con il metodo CLSI per amfotericina B e specie di *Aspergillus*. Un livello di concordanza inferiore è stato osservato per l'itraconazolo; per *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. terreus* la concordanza è risultata >90%, mentre per *A. nidulans* la concordanza è risultata pari all'85% e per *A. ustus* al 33% su pannelli incubati per 48 ore con un inoculo pari a 10^3 cfu/ml. Una concordanza superiore al 90% è stata osservata con un inoculo di 10^4 cfu/ml e un'incubazione di 72 ore per itraconazolo e amfotericina B (M38).
13. Non è stata ancora pienamente stabilita la correlazione tra la MIC della caspofungina e il risultato del trattamento dopo l'impiego di caspofungina. (9)
14. Non sono ancora state stabilite le prestazioni del sistema Sensititre YeastOne con anidulafungina, caspofungina e micafungina con le specie di *Cryptococcus*, *Aspergillus* e lieviti a rapida crescita, **ad eccezione delle specie di *Candida***. Le MIC per anidulafungina, caspofungina e micafungina devono pertanto essere refertate solo per le specie di *Candida*.
15. Le prestazioni della piastra Sensititre YeastOne con posaconazolo con *Cryptococcus* non sono state ancora stabilite.
16. Per refertare i risultati ottenuti con prodotti Sensititre per IVD marcati CE e approvati dalla FDA devono essere utilizzati esclusivamente strumenti supportati dal sistema Sensititre, vale a dire un semplice visore a specchio, Sensititre Vision. Qualsiasi altro sistema utilizzato non sarà supportato.

Prestazioni

I pannelli a lettura manuale sono progettati per fornire prestazioni paragonabili alla procedura di riferimento CLSI di microdiluizione in brodo. Sono definite paragonabili le prestazioni con concordanza essenziale e categorica > 90% entro i limiti di una doppia diluizione della MIC di riferimento (1).

Bibliografia

- (1) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087 (M27).
- (2) Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Messer, S.A., Knapp, C.C., Killian, S., Norris, H.A., Ghannoun M.A. (1999). Multicentre comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric Antifungal Plate with the NCCLS, M27-A Reference Method for Testing Clinical Isolates of Common and Emerging *Candida* spp., and other Yeasts and Yeast-like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**: 591-595.
- (3) Espinel-Ingroff, A., Knapp, C.C., Holliday, N., Killian, S. (2002). Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel for testing voriconazole against Isolates of *Candida* spp., a comparison with the NCCLS M27-A microdilution reference method. *Clinical Microbiology and Infection*. **8**: Suppl 1. Abstract 0125.
- (4) Davey, K.G., Szekely, A., Johnson, E.M., Warnock, D.W., (1998). Comparison of a new commercial colorimetric microdilution method with a standard method for in-vitro susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **42**: 439-444.
- (5) Meletiadiis, J., Moutin, J.W., Meis, F.G.M., Bouman, B.A., Verweij, P.E., and EuroFung Network. (2002). Comparison of the E Test and the Sensititre® Colorimetric Methods with the NCCLS, Proposed Standard for Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**: 2876-2885.
- (6) Espinel-Ingroff, A., *etal.* (1997). Multicenter Evaluation of Proposed Standardized Procedure for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**: 139-143.
- (7) Pemán, J., *etal.* (2001). Comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric method against reference M38-P for testing susceptibility of *Aspergillus* to Amphotericin B and Itraconazole. *Clinical Microbiology and Infection*, **7**: Suppl. 1. Abstract P694.
- (8) Linares, M., J., G. Charriel, F. Solís, F. Rodriguez, A. Ibarra and M. Casal. (2005) Susceptibility of filamentous fungi to voriconazole tested by two microdilution methods. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: 250-253
- (9) Kartsonis, N., *etal.* (2005). Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 3616-3623
- (10) Pfaller, M., A., *etal.* (2004) Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of five antifungal agents against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **50** :113-117
-

- (11) Pfaller, M, A., A. Espinel-Ingroff and R.N. Jones. (2004) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne® antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posiconazole and ravuconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 4577-4580
- (12) Espinel-Ingroff, A., *etal.* (2004) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel with the NCCLS, M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 718- 721
- (13) Linares, M, J., G. Charriel, F. Solís and M. Casal. (2004). Comparison of two microdilution methods for testing susceptibility of *Candida* spp. to voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 899-902
- (14) Espinel-Ingroff, A., M. Pfaller, S.A. Messer, C.C. Knapp, S. Killian, H.A. Norris, and M.A. Ghannoum. (1999) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other Yeasts and Yeast-Like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 591-595
- (15) Barry, A.L., M.A. Pfaller, S.D. Brown, A. Espinel-Ingroff, M.A. Ghannoum, C.c. Knapp, R.P. Rennie, J.H. Rex, and M.G. Rinaldi. (2000) Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3457-3459
- (16) Canton, E., *etal* (2005) .Sensititre YeastOne® Caspofungin susceptibility testing of *Candida* clinical isolates: Correlation with results of NCCLS, M27-A2 multicenter study . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 1604 -1607
- (17) Holliday, N.M., *etal* (2007) A reproducibility study with two echinocandins using the Sensititre YeastOne® susceptibility plate. *American Microbiology Abstract* **C-191**
- (18) Torres-Nabona, M., J. Guinea, J.Martinez_Alarcon, T. Pelaez, and E. Bouza. (2007) *In Vitro* activities of amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole against 45 clinical isolates of Zygomycetes: Comparison of NCCLS, M38-A , Sensititre YeastOne® and the Etest. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 1126 -1129
- (19) Espinel-Ingroff, A. (2006) Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing Zygomycetes, *Aspergillus* spp, *Candida* spp, and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and Amphotericin B. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 3616-3622
- (20) Patel, R., C. Mendrick, C.C. Knapp, R. Grist, and P.M. McNicholas. (2007) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne® plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posaconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2000-2001
- (21) Alexander, B. D., T.C. Byrne, K.L. Smith, K.E. Hansen, K.J. Anstrom, J.R. Perfect and L. B. Reller. (2007) Comparative evaluation of Etest and Sensititre YeastOne® panels against the Clinical Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 698-706
-

(22). Patel, R., *etal.* (2007). Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posiconazole. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**: 2000-2001

DICHIARAZIONE DI NON RESPONSABILITÀ

Le informazioni fornite in questa scheda tecnica riflettono la situazione al momento della stampa e sono soggette a modifica senza preavviso.

Le informazioni più aggiornate possono essere scaricate dal sito www.trekds.com/techinfo o contattando i centri di assistenza tecnica di Thermo Fisher Scientific Microbiology.



Prodotto da TREK Diagnostic Systems (del gruppo Thermo Fisher Scientific Inc)
Units 17-19 Birches Industrial Estate, East Grinstead,
West Sussex. RH19 1XZ, Regno Unito
Tel: +44- 1342-318777



Il logo ATCC Licensed Derivative®, il marchio denominativo ATCC Licensed Derivative® e i marchi del catalogo ATCC sono marchi commerciali di ATCC. Thermo Fisher Scientific Inc. detiene la licenza d'uso di questi marchi commerciali e di vendita dei prodotti derivati da colture ATCC®.

© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. Tutti i diritti riservati. ATCC è un marchio di ATCC. Tutti gli altri marchi sono di proprietà di Thermo Fisher Scientific Inc. e delle sue consociate.



Indirizzi e-mail dei centri di assistenza tecnica

| | |
|------------------------|---|
| Austria | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Belgio | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| Repubblica Ceca | mikrobiologie.tech.podpora.cz@thermofisher.com |
| Danimarca | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Francia | microbiologie.techsupport.fr@thermofisher.com |
| Finlandia | mikrobiologia.tekninentuki.fi@thermofisher.com |
| Germania | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Italia | microbiologia.supportotecnico.it@thermofisher.com |
| Paesi Bassi | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| Norvegia | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Spagna | microbiologia.soporte.es@thermofisher.com |
| Svezia | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Regno Unito | microbiology.techsupport.uk@thermofisher.com |



Gebrauchsanweisung

*Thermo Scientific Sensititre YeastOne Platten für
Empfindlichkeitstests*

| |
|------------------------------------|
| 029-YEAST – ROW-IVD CID9708 |
| Überarbeitungsdatum: 12. Juni 2017 |

THERMO SCIENTIFIC SENSITITRE YEASTONE PLATTEN FÜR EMPFINDLICHKEITSTESTS

Zur *In-vitro*-Diagnostik

Weitere Informationen wie z. B. das Plattenlayout und QK-Bereiche finden Sie unter www.trekds.com/techinfo. Halten Sie den Plattencode und die Chargennummer bereit.

Anwendungsbereich

Die Thermo Scientific™ Sensititre™ YeastOne™ Platte für Empfindlichkeitstests ist eine Mikro-Bouillon-Verdünnung in einem Mikrotiterplattenformat mit 96 trockenen Wells für die *In-vitro*-Diagnostik, die zur quantitativen Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) für nicht anspruchsvolle Hefen wie z. B. *Candida*-Arten, *Cryptococcus*-Arten, *Aspergillus*-Arten und verschiedene andere schnell wachsende Hefearten konzipiert ist.

Anwendungsprinzipien

Sensititre YeastOne ist ein kalorimetrischer Mikro-Bouillon-Verdünnungstest. In jede Mikrotiterplatte werden Antimykotika in geeigneten Verdünnungen und ein Farbindikator zugegeben.

Die Ergebnisse werden manuell ausgewertet, indem die niedrigste Konzentration des Antimykotikums bestimmt wird, bei der kein Wachstum (keine Farbänderung als Nachweis) auftritt.

Vorsichtsmaßnahmen

Die Ergebnisse sollten die Wahl des geeigneten Arzneimittels für die Behandlung lediglich stützen.

Das System sollte nur von geschultem Personal verwendet werden.

Die richtigen Methoden zur Handhabung und Entsorgung der Organismen sind anzuwenden.

Aufbewahrung und Haltbarkeit

Die Platten sollten bei Raumtemperatur (15–25 °C) vor direktem Sonnenlicht und direkter Wärme geschützt aufbewahrt werden. Jede Platte ist zusammen mit einem Silikagel-Trockenmittel folienverpackt. Die Platte oder das Nährmedium nicht verwenden, wenn 1. das Trockenmittel nicht orange gefärbt, 2. das Verfallsdatum abgelaufen oder 3. der Folienbeutel beschädigt ist.

Materialien

Enthalten:

Sensititre YeastOne Platte
Selbstklebende Abdeckfolie

Nicht im Lieferumfang enthalten [mit Artikel- Nr.]:

Thermo Scientific™ Sensititre™ entmineralisiertes Wasser [T3339]

Sensititre YeastOne Bouillon [Y3462]

Thermo Scientific™ Sensititre™ Dosierköpfe (zur Verwendung mit dem Thermo Scientific™ Sensititre™ AIM™ Automated Inoculation Delivery System) [E3010]

Sensititre AIM-System [V3020]

Thermo Scientific™ Sensititre™ Vizion™ Digital MIC Viewing System [V2021]

Thermo Scientific™ Sensititre™ Nephelometer [V3011]

Manueller Viewer [V4007]

0,5-McFarland-Trübungsstandard [E1041]

Impföse

20-µl-Pipette

Steriles Inokulumreservoir

100-µl-Pipette und Einwegspitzen

Qualitätskontrollstämme

Agar-Platten (z. B. Sabauroud-Dextrose-Agar-Platten, SDA) für Pilzwachstum

Inkubator 34–36 °C, ohne CO₂

Vortexmischer

Weitere Materialien, die für Empfindlichkeitstests für *Aspergillus* spp. erforderlich sind

Takashio-Agar oder Kartoffel-Dextrose-Agar

Baumwolltupfer

Sterile Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween™ 20

Gewinnung und Vorbereitung von Proben

Die Proben sollten nach Standard-Verfahren¹ gewonnen, transportiert, gelagert und auf dem primären Isoliermedium ausplattiert werden.

Wahl der Nährlösung für Empfindlichkeitstests

Für das Sensititre-System zugelassene Nährlösungen wurden hinsichtlich ihrer Funktion bei Verwendung mit dem Sensititre-System geprüft.

Beimpfungsverfahren (Empfindlichkeitstests für *Candida* und *Cryptococcus* spp.)

Alle Nährlösungen vor der Verwendung Raumtemperatur annehmen lassen.

Nach Entnahme aus dem Beutel sollte die Beimpfung der Platten innerhalb der nächsten 5 Stunden erfolgen. Es wird eine endgültige Zelldichte der Organismen von ungefähr $1,5-8 \times 10^3$ KBE/ml empfohlen.

Schritt 1 und 2 sollten innerhalb von 15 Minuten durchgeführt werden.

Einige gut abgegrenzte Kolonien mit einem Durchmesser > 1 mm aus einer reinen 24-Stunden-Kultur (Sabauroud-Dextrose-Agar) des Hefeisolats entnehmen und in entmineralisiertem Wasser emulgieren. Gut mischen, falls erforderlich mit einem Vortexmischer, um die Homogenität der Suspension sicherzustellen. Bei Verklumpung, vor der Einstellung der Zelldichte Suspension absetzen lassen. Probe auf 0,5-McFarland-Standard einstellen – entweder mit dem Auge oder dem Sensititre Nephelometer.

1. 20 μ l der Suspension in 11 ml Sensititre YeastOne Nährbouillon transferieren, um ein endgültiges Inokulum von $1,5-8 \times 10^3$ KBE/ml zu erhalten.
2. Innerhalb von 15 Minuten nach Abschluss von Schritt 2 100 μ l der endgültigen Suspension auf die Sensititre YeastOne Platte transferieren. Dazu eines der beiden folgenden Verfahren verwenden:
 - a. **Sensititre AIM System** – Den Röhrchendeckel abnehmen und durch einen Sensititre-Dosierkopf für den Einmalgebrauch ersetzen und die Platte dem Benutzerhandbuch für das Sensititre AIM entsprechend beimpfen. Das Teströhrchen mit aufgesetztem Dosierkopf innerhalb von 30 Sekunden nach Beimpfung einer Platte aus dem Sensititre AIM-System nehmen und umgedreht in einem Rack aufbewahren oder der Entsorgung zuführen.
 - b. **Manuelles Pipettieren** – Das Nährmedium in eine sterile Platte geben und die Platte mit einer geeigneten Pipette beimpfen.
3. Die Anzahl der Kolonien sollte überprüft werden. Dazu 10 μ l aus dem Well der Positivkontrolle entnehmen und auf Sabauroud-Dextrose-Agar (SDA) ausplattieren. Ein korrektes Inokulum ergibt 10–80 Kolonien.
4. Alle Wells mit der selbstklebenden Folie abdecken. Falten vermeiden, damit ein Überspringen von Wells verhindert wird.

Beimpfungsverfahren (Empfindlichkeitstests für *Aspergillus* spp.)^{5-7,}

22

Alle Nährlösungen vor der Verwendung Raumtemperatur annehmen lassen.

Nach Entnahme aus dem Beutel sollte die Beimpfung der Platten innerhalb der nächsten 5 Stunden erfolgen.

Es wird eine endgültige Zelldichte der Organismen von ungefähr $0,5-5 \times 10^4$ KBE/ml empfohlen.

1. Subkultur von Sabouraud-Dextrose-Agar auf Kartoffel-Dextrose-Agar anlegen.
2. 7 Tage bei 35 °C inkubieren, um adäquate Sporenbildung zu erhalten.

3. Konidien mit einem Baumwolltupfer sammeln und in steriler Kochsalzlösung mit Tween™ suspendieren. Schwere Partikel 3 bis 5 Minuten lang absetzen lassen.
4. Überstand entnehmen und mit einem Vortexmischer mischen.
5. Trübung des Überstands auf 80 bis 82 % Transmission bei 530 nm, mit einem Spektralphotometer gemessen, einstellen, was einem Inokulum von $0,6-5 \times 10^6$ KBE/ml entspricht. Alternativ auf einen 0,5-McFarland-Standard einstellen.
6. 100 µl der Suspension zu 11 ml Sensititre YeastOne Nährbouillon hinzufügen, um ein endgültiges Inokulum von $0,5-5 \times 10^4$ KBE/ml zu erhalten.
7. Innerhalb von 15 Minuten nach Abschluss von Schritt 2 100 µl der endgültigen Suspension auf die Sensititre YeastOne Platte transferieren. Dazu eines der beiden folgenden Verfahren verwenden:

a. Sensititre AIM-System

Den Röhrchendeckel abnehmen und durch einen Sensititre-Dosierkopf für den Einmalgebrauch ersetzen und die Platte dem Benutzerhandbuch für das Sensititre AIM entsprechend beimpfen.

Das Teströhrchen mit aufgesetztem Dosierkopf innerhalb von 30 Sekunden nach Beimpfung einer Platte aus dem Sensititre AIM-System nehmen und umgedreht in einem Rack aufbewahren oder der Entsorgung zuführen.

b. **Manuelles Pipettieren** Das Nährmedium in eine sterile Platte geben und die Platte mit einer geeigneten Pipette beimpfen.

8. Anzahl der Kolonien überprüfen. Dazu 10 µl des Inokulums aus dem Well der Positivkontrolle entnehmen und das Inokulum auf Sabauroud-Dextrose-Agar (SDA) ausplattieren. Ein korrektes Inokulum ergibt 50–500 Kolonien.
9. Alle Wells mit selbstklebender Folie abdecken. Falten vermeiden, um ein Überspringen von Wells zu verhindern.

Inkubation

Platten bei 35 °C in einem Inkubator ohne CO₂ inkubieren.

Inkubationstemperaturen von mehr als 35 °C können die Leistung negativ beeinflussen.

- *Candida*-Arten sollten 24 bis 25 Stunden lang inkubiert werden (siehe Schritt 1 im Abschnitt AUSLESEN DER TESTERGEBNISSE)
- *Cryptococcus*-Arten sollten 72 Stunden lang inkubiert werden.
- *Aspergillus*-Arten sollten 48 bis 72 Stunden lang inkubiert werden.

Auslesen der Testergebnisse

Platten können visuell bei normaler Laborbeleuchtung mit einem manuellen Spiegelbetrachter oder mit dem Sensititre Vizion System ausgelesen werden. Siehe Benutzerhandbuch für das Sensititre Vizion System für weitere Informationen. Hefewachstum in den antimykotischen Lösungen wird als Farbwechsel des kolorimetrischen Wachstumsindikators von blau (negativ) nach rot (positiv) nachgewiesen. Einige Hefearten zeigen unter Umständen keinen vollständigen Farbwechsel des Indikators nach rot, sondern eher zu einem Violettton. Einige

Organismen zeigen einen leichten Violetton für Posaconazol, Voriconazol, Fluconazol, Itraconazol und Ketoconazol.

1. Well der Positivkontrolle nach der Inkubation untersuchen.
 - a. *Candida*-Arten sollten 24 bis 25 Stunden lang inkubiert werden (siehe Schritt 1 im Abschnitt AUSLESEN DER TESTERGEBNISSE)
 - b. *Cryptococcus*-Arten sollten 72 Stunden lang inkubiert werden.
 - c. *Aspergillus*-Arten sollten 48 bis 72 Stunden lang inkubiert werden.
2. Ist das Well rot, können die Endpunkte für die Antimykotika bestimmt werden. Für *Candida*-Arten gilt: Ist das Well blau oder leicht violett, für weitere 24 Stunden inkubieren und erneut untersuchen.

NICHT DIE TRÜBUNG DER SENSITITRE YEASTONE PLATTEN MESSEN. Nur den Farbwechsel auslesen.

3. Die MHK ist die niedrigste Konzentration an Antimykotikum, die das Wachstum von Organismen nachhaltig hemmt, was durch Farbänderung nachgewiesen wird.

Auswertung der Ergebnisse

TABELLE 1. Illustration und Interpretation der möglicherweise auftretenden Testergebnisse

| Konzentration im Well in µg/ml | | | | | | | R = ROT: Positives Wachstumsindiz B = BLAU: Negatives Wachstumsindiz |
|--------------------------------|---|---|---|---|----|----|---|
| | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | |
| A. | R | R | R | B | B | B | Typisches Wachstumsmuster, MHK-Endpunkt ist 8 µg/ml. |
| B. | R | R | R | R | R | R | Wachstum in allen Wells, MHK-Endpunkt ist > 32 µg/ml. |
| C. | B | B | B | B | B | B | Wachstum in keinem Well, MHK-Endpunkt ist < 1 µg/ml. |
| D. | R | R | R | B | R | R | „Übersprungenes Well“. MHK-Endpunkt ist > 32 µg/ml. Ignorieren Sie ein „übersprungenes Well“, wenn die Nachbarwells auf beiden Seiten Wachstum aufweisen. Tritt mehr als ein „übersprungenes Well“ in einer Reihe auf, sind die Testergebnisse ungültig. ¹ |

| | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|
| E. | R | R | B | B | R | R | Zwei „übersprungene Wells“. Der Test sollte wiederholt werden. ¹ |
|----|---|---|---|---|---|---|---|

¹Bei sorgfältiger Durchführung tritt dies nicht häufig auf.

Hinweise zum Auslesen

Amphotericin B

Die Endpunkte für Amphotericin B nach 24 Stunden können in der Regel einfach bestimmt werden; als MHK wird die niedrigste Wirkstoffkonzentration abgelesen, die eine sichtbare Farbänderung verhindert. Ein Trailing des Endpunkts tritt bei Amphotericin B in der Regel nicht auf.

Das erste Well, das eine deutliche Farbänderung im Vergleich zur Positivkontrolle zeigt, ist die MHK.



Flucytosin und Azol-Antimykotika

Für *Candida albicans*, *C. glabrata* und *C. tropicalis* können sich mit Flucytosin und Azolen wie z. B. Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol, Voriconazol und Posaconazol Endpunkte ergeben, die in der Regel aufgrund von Trailing beim Wachstum weniger scharf ausgeprägt sind, was eine erhebliche Variationsquelle darstellt. Trailing tritt auf, wenn eine leichte Farbänderung fortbesteht, die sich häufig in identischer Weise bei allen Wirkstoffkonzentrationen oberhalb der MHK zeigt. Als MHK sollte das erste Well abgelesen werden, das eine weniger intensive Farbänderung im Vergleich zur Positivkontrolle aufweist. Referenzstämme mit definierter Empfindlichkeit können bei der Schulung des Personals helfen. Bei Isolaten von *Candida krusei* wird davon ausgegangen, dass sie von sich aus gegen Fluconazol resistent sind. Ihre MHK sollten nicht interpretiert werden, dem berichteten Testergebnis sollte (1) ein Kommentar hinzugefügt werden.

Endpunkt mit Trailing: Dies tritt auf, wenn eine leichte Farbänderung besteht, die sich häufig in identischer Weise in mehreren Konzentrationen zeigt. Als MHK sollte das erste Well abgelesen werden, das eine weniger intensive Farbänderung im Vergleich zur Positivkontrolle aufweist.



Echinocandine

MHK-Endpunkte sollten nach 24-stündiger Inkubation bei 35 °C bestimmt werden. Als MHK sollte das erste Well abgelesen werden, das eine weniger intensive Farbänderung im Vergleich zur Positivkontrolle aufweist.



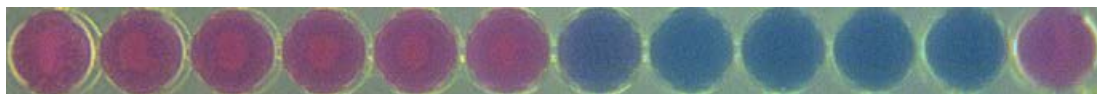
Itraconazol

Itraconazol kann gelegentlich bei Konzentrationen $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ ausfallen. Dies kann dazu führen, dass das betroffene Well Wachstum aufweist und rot wird.



Von Zeit zu Zeit ist ein paradoxes Wachstum bei höheren Itraconazol-Konzentrationen auf Sensititre YeastOne Panels anzutreffen, was zu einer Rosafärbung dieser Wells führt.

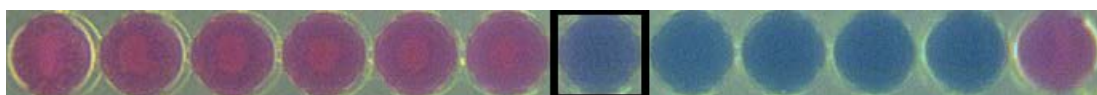
Der paradoxe Effekt, der auch als Eagle-Phänomen bekannt ist, nimmt Bezug auf eine Beobachtung, bei der ein Anstieg der antimikrobiellen Konzentration über einen bestimmten Punkt hinaus paradoxerweise zu einem Anstieg der Anzahl an Bakterien führt, die überleben. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Konzentration zu hoch ist; der Wirkstoff könnte eine Selbstantagonisierung des Rezeptors bewirken, an den er bindet (z. B. penicillinbindende Proteine im Fall von Penicillin).



0,008 0,015 0,03 0,06 0,12 0,25 0,5 1 2 4 8 16

Auflösung

Das Wachstum in der höheren Konzentration sollte ignoriert werden, es sei denn, es liegt Wachstum in allen anderen Itraconazolkonzentrationen vor. Im folgenden Beispiel ist das Well mit der Konzentration von $0,5 \mu\text{g/ml}$, das durch ein schwarzes Quadrat markiert ist, das Well, das als MHK-Ergebnis aufgezeichnet werden sollte.



0,008 0,015 0,03 0,06 0,12 0,25 0,5 1 2 4 8 16

Haben Sie weitere Fragen oder Anliegen, nehmen Sie bitte telefonisch Kontakt mit der Abteilung für technischen Support auf: +44 (0) 1256 694287 | Fax: +44 (0) 1256 463388 oder siehe Seite 12 für die Liste der E-Mail-Adressen.

Kontamination/Übersprungene Wells

Ein rosafarbenes Well (Wachstum) zwischen blauen Wells (kein Wachstum) kann auch ein Anzeichen für eine Kontamination sein. Legen Sie eine Subkultur des Wellinhalts an, um die Ursache zu überprüfen.

Ein blaues Well in einer Reihe von roten Wells mit Wachstum zeigt ein „übersprungenes Well“ an und sollte ignoriert werden. Die MHK sollte oberhalb übersprungener Wells abgelesen werden. Gibt es mehr als ein übersprungenes Well, sollte das Antimykotikum nicht berichtet werden.

Qualitätskontrolle

Die Häufigkeit der Durchführung von Qualitätskontrollen sollte gemäß der Richtlinien vor Ort festgesetzt werden.¹

Zur Überprüfung der Reinheit sollte eine Kultur des Inokulums auf einem geeigneten Medium angelegt werden. Wenn eine Mischkultur vorhanden ist, sind die Testergebnisse ungültig.

Alle Sensititre Platten enthalten Wells zur Positivkontrolle. Die Tests sind nur dann gültig, wenn in allen Positivkontroll-Wells deutliches Wachstum beobachtet wird.

Die folgenden Kulturen der American Type Culture Collection (ATCC™) werden zur Verwendung als Qualitätskontrolle empfohlen:

Issatchenkia orientalis (*Candida krusei*) ATCC 6258

Candida parapsilosis ATCC 22019

Ergebnisse dürfen **nicht** berichtet werden, wenn die QK-Ergebnisse nicht im erwarteten Bereich liegen.

Die Beimpfung, Ablesung und Interpretation von Sensititre YeastOne Platten für Hefeempfindlichkeitstests bei der Durchführung von Qualitätskontrolltests durch den Anwender ist wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben durchzuführen.

Tabelle 2. Empfohlene 24- und 48-Stunden-MHK-Grenzwerte für zwei Qualitätskontrollstämme gemäß Bouillon-Mikrodilution CLSI M27 (Ref. 2). Von den veröffentlichten Qualitätskontrollbereichen abweichende und zusätzliche Bereiche sind unterstrichen.

| Antimykotikum | <i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC6258 | | <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 | |
|----------------|--|------------|---|------------|
| | 24 Stunden | 48 Stunden | 24 Stunden | 48 Stunden |
| 5-Flucytosin | 4–16 | 8–32 | <u>0,12–0,5</u> | 0,12–0,5 |
| Amphotericin B | 0,5–2 | 1–4 | 0,25–2 | 0,5–4 |
| Anidulafungin | 0,03–0,12 | - | 0,25–2 | - |

| | | | | |
|-------------|-----------|----------|------------|------------|
| Caspofungin | 0,12–1 | 0,25–1 | 0,25–1 | 0,5–4 |
| Fluconazol | 8–64 | 16–128 | 0,5–4 | <u>2–8</u> |
| Itraconazol | 0,12–1 | 0,25–1 | 0,06–0,5 | 0,12–0,5 |
| Micafungin | 0,06–0,5* | 0,12–0,5 | 0,5–2 | 0,5–4 |
| Posaconazol | 0,06–0,5 | 0,12–1 | 0,03–0,25 | 0,06–0,25 |
| Voriconazol | 0,06–0,5 | 0,12–1 | 0,015–0,12 | 0,03–0,25 |

* Sensititre-Bereich

Erwartete QK-Werte gibt es in CLSI M27; für *Aspergillus*, siehe Orientierungsdokument M38.

Bei Isolaten von *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*) wird davon ausgegangen, dass sie intrinsisch gegen Fluconazol resistent sind. Ihre MHK sollten nicht mit dieser Skala interpretiert werden.

HINWEIS 1: Werden minimale Hemmkonzentrationen (MHK) für *Candida*-Arten mit Hilfe einer Skala gemessen und fällt das erzielte Ergebnis zwischen zwei Kategorien, gilt die nächsthöhere Kategorie. D. h. ein Isolat mit einer MHK für Fluconazol von 12,5 µg/ml würde in die Kategorie S-DD eingeordnet.

Um weitere Informationen zur Interpretation von Ergebnissen zu erhalten, wenden Sie sich bitte an das CLSI¹.

Einschränkungen

1. Sensititre YeastOne Platten für Empfindlichkeitstests sind zur Verwendung für nicht anspruchsvolle Hefen wie z. B. *Candida*-Arten, *Cryptococcus*-Arten, *Aspergillus*-Arten und verschiedene schnell wachsende Hefearten bestimmt. Sie sind nicht bestimmt für anspruchsvolle oder langsam wachsende Hefen wie z. B. *Histoplasma* oder *Blastomyces* und Fadenpilze.
2. Ein Vergleich zwischen dem Sensititre YeastOne-System nach 24 Stunden und der CLSI-Referenzmethode nach 48 Stunden wurde evaluiert. Aufgrund der Schwierigkeit bei der Korrelation von Endpunkten von Organismen mit Trailing (*C. albicans*) nach einer Inkubation von 48 Stunden werden jedoch hohe Fehlerraten beobachtet.
3. Untersuchungen auf Pilze und Antimykotika sind von sich aus weniger genau als Untersuchungen auf Bakterien.
4. Einige Prüfer sind der Meinung, dass das Auslesen nach 24 Stunden geeigneter ist als das Auslesen nach 48 Stunden, da es das Problem des Trailings bei bestimmten Isolaten gibt. Der offizielle CLSI-Standard gibt an, dass nach 48 Stunden ausgelesen werden sollte. Bis eine ausreichende Datenmenge erhoben und analysiert sein wird, bleibt die Frage nach dem klinisch relevantesten Zeitpunkt für das Auslesen unbeantwortet. Beim Berichten der Ergebnisse sollte der Zeitpunkt des Auslesens deutlich angegeben werden.
5. Weitere Orientierung finden Sie im CLSI-Standard für Empfindlichkeitstests gegen Antimykotika M27 für Hefen und M38 für *Aspergillus*-Arten.
6. Das Indiz für den Endpunkt ist die Farbänderung, nicht die Trübung. (Diese Tatsache entkräftet einige der Hauptbedenken bei der Interpretation für bestimmte *Candida*-Arten)

aufgrund von „Trailing“ ab. Trailing wird häufiger bei Isolaten beobachtet, die nicht aus Blutproben oder anderen sterilen Körperflüssigkeiten gewonnen werden.)

7. Test nicht nach 24 Stunden auslesen, wenn das Kontrollwell nicht vollständig nach positiv umgeschlagen ist.
8. Die Leistung von Voriconazol bei *Cryptococcus*-Arten und schnell wachsenden Hefearten wurde nicht bestimmt. MHK von Voriconazol sollten daher nur für *Candida*-Arten berichtet werden.
9. Nur mit für das Sensititre-System zugelassenes Nährmedium für das Inokulum für Hefeempfindlichkeitstests verwenden. Die Verwendung anderer Nährmedien kann zu Fehlern führen.
10. Wie bei jeder *In-vitro*-Empfindlichkeitstestmethode sollten die Untersuchungsergebnisse mit dem klinischen Ansprechen des Patienten auf die verschriebene Therapie korreliert werden.
11. Die Leistung wurde nur für Amphotericin B, Itraconazol, Posaconazol und Voriconazol für *Aspergillus*-Arten ermittelt.
12. Literaturverweis 5 zeigt ein hohes Maß an Übereinstimmung (> 99 %) mit der CLSI-Methode für Amphotericin B und *Aspergillus*-Arten. Bei Itraconazol war die Übereinstimmung geringer, *A. fumigatus*, *A. flavus* und *A. terreus* hatten eine Übereinstimmung > 90 %, während *A. nidulans* eine Übereinstimmung von 85 % und *A. ustus* eine Übereinstimmung von 33 % auf Panels hatten, die 48 Stunden lang mit einem Inokulum von 10^3 KBE/ml inkubiert wurden. Eine Übereinstimmung von mehr als 90 % wurde mit einem Inokulum von 10^4 KBE/ml und 72-stündiger Inkubation mit Itraconazol und Amphotericin B beobachtet (M38).
13. Eine Korrelation der MHK für Caspofungin mit dem Behandlungsergebnis nach einer Anwendung von Caspofungin wurde bisher nicht vollständig ermittelt. (9)
14. Die Leistung des Sensititre YeastOne Systems mit Anidulafungin, Caspofungin und Micafungin bei *Cryptococcus*, *Aspergillus*-Arten und schnell wachsenden Hefearten, **außer *Candida*-Arten**, wurde bisher nicht ermittelt. MHK von Anidulafungin, Caspofungin und Micafungin sollten daher nur für *Candida*-Arten berichtet werden.
15. Die Leistung der Sensititre YeastOne Platten mit Posaconazol bei *Cryptococcus* wurde bisher nicht ermittelt.
16. Zur Erstellung von Ergebnisberichten bei Sensititre-Produkten für die In-vitro-Diagnostik mit CE-Kennzeichnung und FDA-Zulassung dürfen nur Geräte verwendet werden, die vom Sensititre System unterstützt werden, d. h. ein einfacher Spiegelbetrachter und Sensititre Vizion. Andere Systeme werden nicht unterstützt.

Leistung

Panels, die manuell gelesen werden, sind dazu ausgelegt, eine mit der CLSI-Referenzmethode der Mikroverdünnung einer Nährbouillon vergleichbare Leistung zu ergeben. Vergleichbare Leistung ist definiert als > 90%ige unerlässliche und kategorische Übereinstimmung mit dem Wert innerhalb einer doppelten Verdünnung der Referenz-MHK (1).

Literaturverweise

- (1) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087 (M27).
- (2) Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Messer, S.A., Knapp, C.C., Killian, S., Norris, H.A., Ghannoun M.A. (1999). Multicentre comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric Antifungal Plate with the NCCLS, M27-A Reference Method for Testing Clinical Isolates of Common and Emerging *Candida* spp., and other Yeasts and Yeast-like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**: 591-595.
- (3) Espinel-Ingroff, A., Knapp, C.C., Holliday, N., Killian, S. (2002). Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel for testing voriconazole against Isolates of *Candida* spp., a comparison with the NCCLS M27-A microdilution reference method. *Clinical Microbiology and Infection*. **8**: Suppl 1. Abstract 0125.
- (4) Davey, K.G., Szekely, A., Johnson, E.M., Warnock, D.W., (1998). Comparison of a new commercial colorimetric microdilution method with a standard method for in-vitro susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **42**: 439-444.
- (5) Meletiadiis, J., Moutin, J.W., Meis, F.G.M., Bouman, B.A., Verweij, P.E., and EuroFung Network. (2002). Comparison of the E Test and the Sensititre® Colorimetric Methods with the NCCLS, Proposed Standard for Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**: 2876-2885.
- (6) Espinel-Ingroff, A., et al. (1997). Multicenter Evaluation of Proposed Standardized Procedure for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**: 139-143.
- (7) Pemán, J., et al. (2001). Comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric method against reference M38-P for testing susceptibility of *Aspergillus* to Amphotericin B and Itraconazole. *Clinical Microbiology and Infection*, **7**: Suppl. 1. Abstract P694.
- (8) Linares, M., J., G. Charriel, F. Solís, F. Rodriguez, A. Ibarra and M. Casal. (2005) Susceptibility of filamentous fungi to voriconazole tested by two microdilution methods. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: 250-253.
- (9) Kartsonis, N., et al. (2005). Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 3616-3623.
- (10) Pfaller, M., A., et al. (2004) Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of five antifungal agents against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **50**: 113-117.

- (11) Pfaller, M, A., A. Espinel-Ingroff and R.N. Jones. (2004) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne[®] antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posiconazole and ravuconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 4577-4580.
- (12) Espinel-Ingroff, A., *et al.* (2004) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne[®] colorimetric antifungal panel with the NCCLS, M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 718-721.
- (13) Linares, M, J., G. Charriel, F. Solís and M. Casal. (2004). Comparison of two microdilution methods for testing susceptibility of *Candida* spp. to voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 899-902.
- (14) Espinel-Ingroff, A., M. Pfaller, S.A. Messer, C.C. Knapp, S. Killian, H.A. Norris, and M.A. Ghannoum. (1999) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne[®] colorimetric antifungal panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other Yeasts and Yeast-Like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 591-595.
- (15) Barry, A.L., M.A. Pfaller, S.D. Brown, A. Espinel-Ingroff, M.A. Ghannoum, C.c. Knapp, R.P. Rennie, J.H. Rex, and M.G. Rinaldi. (2000) Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3457-3459.
- (16) Canton, E., *et. al* (2005) Sensititre YeastOne[®] Caspofungin susceptibility testing of *Candida* clinical isolates: Correlation with results of NCCLS, M27-A2 multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 1604-1607.
- (17) Holliday, N.M., *et al.* (2007) A reproducibility study with two echinocandins using the Sensititre YeastOne[®] susceptibility plate. *American Microbiology Abstract* **C-191**.
- (18) Torres-Nabona, M., J. Guinea, J.Martinez_Alarcon, T. Pelaez, and E. Bouza. (2007) *In Vitro* activities of amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole against 45 clinical isolates of Zygomycetes: Comparison of NCCLS, M38-A , Sensititre YeastOne[®] and the Etest. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 1126 -1129.
- (19) Espinel-Ingroff, A. (2006) Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing Zygomycetes, *Aspergillus* spp, *Candida* spp, and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and Amphotericin B. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 3616-3622.
- (20) Patel, R., C. Mendrick, C.C. Knapp, R. Grist, and P.M. McNicholas. (2007) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne[®] plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posaconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2000-2001.
- (21) Alexander, B. D., T.C. Byrne, K.L. Smith, K.E. Hansen, K.J. Anstrom, J.R. Perfect and L. B. Reller. (2007) Comparative evaluation of Etest and Sensititre YeastOne[®] panels against the Clinical Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 698-706.
-

(22). Patel, R., *et al.* (2007). Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posiconazole. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**: 2000-2001.

HAFTUNGSAUSSCHLUSS

Die Angaben in dieser technischen Beilage sind zum Zeitpunkt der Drucklegung aktuell und können ohne Ankündigung geändert werden.

Die neuesten Informationen stehen auf www.trekds.com\techinfo zum Download zur Verfügung oder sind auf

Anfrage vom technischen Kundendienst von Thermo Fisher Scientific Microbiology erhältlich.



Hergestellt von TREK Diagnostic Systems (Teil von Thermo Fisher Scientific Inc.)
Units 17-19 Birches Industrial Estate, East Grinstead,
West Sussex. RH19 1XZ, GB.
Tel.: +44- 1342-318777



Das ATCC Licensed Derivative®-Emblem, die ATCC Licensed Derivative®-Wortmarke und die ATCC-

Katalogmarken sind Handelsmarken von ATCC. Thermo Fisher Scientific Inc. ist Inhaber einer Lizenz zur Nutzung dieser

Handelsmarken und zum Verkauf von Produkten aus ATCC®-Kulturen.

© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. Alle Rechte vorbehalten. ATCC ist eine Handelsmarke von ATCC. Alle anderen Marken sind Eigentum des Unternehmens Thermo Fisher Scientific Inc. und seiner Tochtergesellschaften.



E-Mail-Adressen des technischen Supports

| | |
|-------------------------------|---|
| Österreich | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Belgien | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| Tschechische Republik | mikrobiologie.tech.podpora.cz@thermofisher.com |
| Dänemark | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Frankreich | microbiologie.techsupport.fr@thermofisher.com |
| Finnland | mikrobiologia.tekninentuki.fi@thermofisher.com |
| Deutschland | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Italien | microbiologia.supportotecnico.it@thermofisher.com |
| Niederlande | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| Norwegen | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Spanien | microbiologia.soporte.es@thermofisher.com |
| Schweden | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Technischer Support UK | microbiology.techsupport.uk@thermofisher.com |

Οδηγίες χρήσης

*Πλάκες ευαισθησίας Sensititre YeastOne
της Thermo Scientific*

| |
|--|
| 029-YEAST – ROW-IVD CID9708 |
| Ημερομηνία αναθεώρησης: 12 Ιουνίου, 2017 |

ΠΛΑΚΕΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ SENSITITRE YEASTONE ΤΗΣ THERMO SCIENTIFIC

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

Για περισσότερες πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένης της διάταξης πλακών και των ευρών ποιοτικού ελέγχου, ανατρέξτε στη διαδικτυακή τοποθεσία www.trekds.com/techinfo. Απαιτείται κωδικός πλάκας και αριθμός παρτίδας.

Χρήση για την οποία προορίζεται

Η πλάκα ευαισθησίας Sensititre™ YeastOne™ της Thermo Scientific™ είναι μια *in vitro* διαγνωστική μέθοδος μικροαραίωσης σε ζυμό με τη μορφή αποξηραμένης μικροπλάκας 96 υποδοχών που παρέχει ποσοτικά αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) για ζυμομύκητες χωρίς σύνθετες θρεπτικές ανάγκες, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Candida*, των ειδών *Cryptococcus*, των ειδών *Aspergillus* και διαφόρων άλλων ειδών ταχέως αναπτυσσόμενων ζυμομυκητών.

Αρχές χρήσης

Το Sensititre YeastOne είναι μια χρωματομετρική δοκιμασία μικροαραιώσεων σε ζυμό. Σε κάθε μικροπλάκα χορηγούνται αντιμυκητιασικοί παράγοντες σε κατάλληλες αραιώσεις και ένα ένας χρωματομετρικός δείκτης.

Τα αποτελέσματα διαβάζονται μη αυτόματα με την παρακολούθηση της ελάχιστης αντιμυκητιασικής συγκέντρωσης στην οποία δεν παρουσιάζεται ανάπτυξη (όπως αποδεικνύεται από την απουσία αλλαγής του χρώματος).

Προφυλάξεις

Τα αποτελέσματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως βοήθημα στην επιλογή του φαρμάκου εκλογής για τη θεραπεία.

Ο χειρισμός του συστήματος θα πρέπει να γίνεται μόνο από εκπαιδευμένο προσωπικό.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες μέθοδοι χειρισμού και απόρριψης των μικροοργανισμών.

Φύλαξη και διάρκεια ζωής

Οι πλάκες θα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (15 °C - 25 °C) μακριά από άμεση ηλιακή ακτινοβολία και άμεση θερμότητα. Κάθε πλάκα συσκευάζεται σε φύλλο αλουμινίου, με αποξηραντικό με γέλη από οξείδιο του πυριτίου. Μη χρησιμοποιείτε την πλάκα ή τον ζυμό εάν (1) το χρώμα του αποξηραντικού δεν είναι πορτοκαλί, (2) η ημερομηνία λήξης έχει παρέλθει ή (3) η θήκη από φύλλο αλουμινίου έχει υποστεί ζημιά.

Υλικά

Περιλαμβάνονται:

Πλάκα Sensititre YeastOne

Αυτοκόλλητο στεγανωτικό σφράγισμα

Δεν περιλαμβάνονται [Κωδικός προϊόντος]:

Αφαλατωμένο νερό Sensititre™ της Thermo Scientific™ [T3339]

Ζυμός Sensititre YeastOne [Y3462]

Δοσιμετρικές κεφαλές Sensititre™ της Thermo Scientific™ (για χρήση με το αυτοματοποιημένο σύστημα εφαρμογής ενοφθαλμισμού Sensititre™ AIM™ της Thermo Scientific™) [E3010]

Σύστημα Sensititre AIM [V3020]

Ψηφιακό σύστημα προβολής MIC Sensititre™ Vizion™ της Thermo Scientific™ [V2021]

Νεφελόμετρο Sensititre™ της Thermo Scientific™ [V3011]

Μη αυτόματο σύστημα προβολής [V4007]

Πρότυπο θολερότητας 0,5 της κλίμακας McFarland [E1041]

Βακτηριολογικός κρίκος

Πιπέτα των 20 μl

Αποστειρωμένος περιέκτης ενοφθαλμίσματος

Πιπέτα 100 μl και αναλώσιμα ρύγχη

Στελέχη ποιοτικού ελέγχου

Πλάκες ανάπτυξης μυκήτων με άγαρ, π.χ. άγαρ δεξτρόζης Sabauroud (SDA)

Επωαστήρας 34 - 36 °C, που λειτουργεί χωρίς CO₂

Αναδευτήρας τύπου vortex

Πρόσθετα υλικά που απαιτούνται για τη δοκιμασία *Aspergillus* spp.

Άγαρ Takashio ή άγαρ δεξτρόζης πατάτας

Βαμβakoφόρο μάκτρο

Αποστειρωμένος φυσιολογικός ορός με 0,05% Tween™ 20

Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα θα πρέπει να συλλέγονται, να μεταφέρονται, να φυλάσσονται και να τοποθετούνται σε πλάκες με πρωτογενές μέσο απομόνωσης, χρησιμοποιώντας τυπικές διαδικασίες¹.

Επιλογή του ζυμού της δοκιμασίας ευαισθησίας

Οι ζυμοί που έχουν εγκριθεί από το σύστημα Sensititre έχουν δοκιμαστεί, ως προς την απόδοση τους, για χρήση με το σύστημα Sensititre.

Διαδικασία ενοφθαλμισμού (δοκιμασία *Candida* και *Cryptococcus* spp.)

Αφήστε όλους τους ζυμούς να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.

Οι πλάκες θα πρέπει να ενοφθαλμίζονται εντός 5 ωρών από την αφαίρεση από τη θήκη. Συνιστάται τελική πυκνότητα μικροοργανισμών περίπου $1,5 - 8 \times 10^3$ CFU/ml.

Τα βήματα 1 και 2 θα πρέπει να ολοκληρώνονται εντός 15 λεπτών.

Πάρτε αρκετές καλά απομονωμένες αποικίες διαμέτρου >1 mm από μια αμιγή καλλιέργεια 24 ωρών (άγαρ δεξτρόζης Sabauroud) του απομονωμένου στελέχους του ζυμομύκητα και γαλακτωματοποιήστε σε αφαλατωμένο νερό. Ανακατέψτε καλά, διασφαλίζοντας ότι το εναιώρημα είναι ομοιόμορφο. Περιδινήστε, εάν απαιτείται. Εάν σχηματιστεί συμπαγής μάζα, αφήστε το εναιώρημα να κατακαθίσει προτού προσαρμόσετε την πυκνότητα. Προσαρμόστε το πρότυπο 0,5 της κλίμακας McFarland οπτικά ή με το νεφελόμετρο Sensititre.

1. Μεταφέρετε 20 μl του εναιωρήματος στα 11 ml του ζωμού Sensititre YeastOne για να δημιουργηθεί ένα τελικό ενοφθάλμισμα $1,5 - 8 \times 10^3$ CFU/ml.
2. Μεταφέρετε 100 μl του τελικού εναιωρήματος στην πλάκα Sensititre YeastOne εντός 15 λεπτών από την ολοκλήρωση του βήματος 2 με οτιδήποτε από τα δύο:
 - a. **Σύστημα Sensititre AIM** - Αντικαταστήστε το πώμα του σωληναρίου με μία δοσιμετρική κεφαλή Sensititre μίας χρήσης και ενοφθαλμίστε την πλάκα, σύμφωνα με το εγχειρίδιο χρήσης του Sensititre AIM. Αφαιρέστε τον συνδυασμό δοκιμαστικού σωληναρίου-δοσιμετρικής κεφαλής από το σύστημα Sensititre AIM εντός 30 δευτερολέπτων από τη χορήγηση δόσης σε πλάκα και φυλάξτε ανεστραμμένο σε ένα φορέα ή απορρίψτε
 - b. **Μη αυτόματη πιπέτα** – Χύστε τον ζωμό σε αποστειρωμένο δισκίο ενοφθαλμισμού και ενοφθαλμίστε την πλάκα, χρησιμοποιώντας κατάλληλη πιπέτα
3. Θα πρέπει να γίνεται έλεγχος του αριθμού των αποικιών αφαιρώντας 10 μl από την υποδοχή θετικού μάρτυρα και τοποθετώντας τα σε πλάκα στο άγαρ δεξτρόζης Sabauroud (SDA). Το σωστό ενοφθάλμισμα θα δημιουργήσει 10-80 αποικίες
4. Καλύψτε όλες τις υποδοχές με το αυτοκόλλητο στεγανωτικό σφράγισμα. Εάν αποφύγετε τις πτυχώσεις θα αποτρέψετε την παράλειψη υποδοχών

Διαδικασία ενοφθαλμισμού (δοκιμασία *Aspergillus* spp.)^{5-7, 22}

Αφήστε όλους τους ζωμούς να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.

Οι πλάκες θα πρέπει να ενοφθαλμίζονται εντός 5 ωρών από την αφαίρεση από τη θήκη.

Συνιστάται τελική πυκνότητα μικροοργανισμών περίπου $0,5-5 \times 10^4$ CFU/ml.

1. Ανακαλλιέργεια από άγαρ δεξτρόζης Sabouraud σε άγαρ δεξτρόζης πατάτας.
2. Επώαστε για 7 ημέρες στους 35°C για να επιτύχετε επαρκή σποροποίηση.
3. Συλλέξτε τα κονίδια με βαμβakoφόρο μάκτρο και εναιωρήστε σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό TweenTM. Αφήστε τα βαριά σωματίδια να κατακαθίσουν για 3 έως 5 λεπτά.
4. Συλλέξτε το υπερκείμενο και αναμείξτε με αναδευτήρα τύπου vortex
5. Προσαρμόστε τη θολερότητα του υπερκειμένου σε διαπερατότητα 80 έως 82% στα 530 nm, όπως μετράται με φασματοφωτόμετρο ισοδύναμο με ενοφθάλμισμα $0,6 - 5 \times 10^6$ cfu/ml. Εναλλακτικά, προσαρμόστε με πρότυπο 0,5 της κλίμακας McFarland.

6. Προσθέστε 100 µl του εναιωρήματος στα 11 ml του ζωμού Sensititre YeastOne για να δημιουργηθεί ένα τελικό ενοφθάλμισμα $0,5-5 \times 10^4$ cfu/ml.
7. Μεταφέρετε 100 µl του τελικού εναιωρήματος στην πλάκα Sensititre YeastOne εντός 15 λεπτών από την ολοκλήρωση του βήματος 2 με οτιδήποτε από τα δύο:

a. Σύστημα Sensititre AIM.

Αντικαταστήστε το πώμα του σωληναρίου με μία δοσιμετρική κεφαλή Sensititre μίας χρήσης και ενοφθαλμίστε την πλάκα, σύμφωνα με το εγχειρίδιο χρήσης του Sensititre AIM.

Αφαιρέστε τον συνδυασμό δοκιμαστικού σωληναρίου-δοσιμετρικής κεφαλής από το σύστημα Sensititre AIM εντός 30 δευτερολέπτων από τη χορήγηση δόσης σε πλάκα και φυλάξτε ανεστραμμένο σε ένα φορέα ή απορρίψτε.

b. Μη αυτόματη πιπέτα. Χύστε τον ζωμό σε αποστειρωμένο δισκίο ενοφθαλμισμού και ενοφθαλμίστε την πλάκα, χρησιμοποιώντας κατάλληλη πιπέτα.

8. Θα πρέπει να γίνεται έλεγχος του αριθμού των αποικιών του ενοφθαλμίσματος αφαιρώντας 10 µl από την υποδοχή θετικού μάρτυρα και τοποθετώντας το ενοφθάλμισμα σε πλάκα στο άγαρ δεξτρόζης Sabauroud (SDA). Το σωστό ενοφθάλμισμα θα δημιουργήσει 50-500 αποικίες.
9. Καλύψτε όλες τις υποδοχές με ένα αυτοκόλλητο στεγανωτικό σφράγισμα. Εάν αποφύγετε τις πτυχώσεις θα αποτρέψετε την παράλειψη υποδοχών.

Επώαση

Επώαστε τις πλάκες σε θερμοκρασία 35 °C σε επωαστήρα που δεν χρησιμοποιεί CO₂.

Θερμοκρασίες επώασης άνω των 35 °C μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση.

- Τα είδη *Candida* θα πρέπει να επωάζονται για 24 έως 25 ώρες (ανατρέξτε στο βήμα 1, στην ενότητα ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ)
- Τα είδη *Cryptococcus* θα πρέπει να επωάζονται για 72 ώρες.
- Τα είδη *Aspergillus* θα πρέπει να επωάζονται για 48 έως 72 ώρες.

Ανάγνωση αποτελεσμάτων δοκιμασιών

Η ανάγνωση των πλακών μπορεί να γίνει οπτικά υπό φυσιολογικό φωτισμό εργαστηρίου, με χρήση μη αυτόματου συστήματος προβολής με κάτοπτρα ή χρησιμοποιώντας το σύστημα Sensititre Vizion. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του συστήματος Sensititre Vizion για πρόσθετες πληροφορίες. Η ανάπτυξη ζυμομυκήτων στα αντιμυκητιασικά διαλύματα θα γίνεται εμφανής ως αλλαγή του χρώματος στον χρωματομετρικό δείκτη ανάπτυξης από μπλε (αρνητικό) σε κόκκινο (θετικό). Ορισμένα είδη ζυμομυκήτων μπορεί να μην αλλάζουν το χρώμα του δείκτη πλήρως σε κόκκινο, αλλά να εμφανίζονται πιο πολύ ως μωβ χρώμα. Ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορεί να παρουσιάζουν ελαφρύ μωβ χρωματισμό στην ποσακοναζόλη, τη βορικοναζόλη, τη φλουκοναζόλη, την ιπρακοναζόλη και την κετοκοναζόλη.

1. Εξετάστε την υποδοχή θετικής ανάπτυξης μετά την επώαση
 - a. Τα είδη *Candida* θα πρέπει να επωάζονται για 24 έως 25 ώρες (ανατρέξτε στο βήμα 1, στην ενότητα ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ)

- b. Τα είδη *Cryptococcus* θα πρέπει να επωάζονται για 72 ώρες
 c. Τα είδη *Aspergillus* θα πρέπει να επωάζονται για 48 έως 72 ώρες
2. Εάν η υποδοχή ανάπτυξης είναι κόκκινη, μπορούν να προσδιοριστούν τα τελικά σημεία για τα αντιμυκητιασικά. Για τα είδη *Candida*, εάν η υποδοχή έχει μπλε ή αχνό μωβ χρώμα, επαναλάβετε την επώαση για 24 ακόμη ώρες και επανεξετάστε.

ΜΗ ΔΙΑΒΑΖΕΤΕ ΤΗ ΘΟΛΕΡΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΠΛΑΚΑ SENSITITRE YEASTONE. Διαβάστε μόνο την αλλαγή του χρώματος.

3. Η MIC είναι η ελάχιστη συγκέντρωση ενός αντιμυκητιασικού παράγοντα που αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, όπως ανιχνεύεται από την αλλαγή του χρώματος.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Εμφάνιση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών που μπορεί να εμφανιστούν

| Συγκέντρωση υποδοχής µg/ml | | | | | | | K = ΚΟΚΚΙΝΟ: Θετική ένδειξη ανάπτυξης M = ΜΠΛΕ: Αρνητική ένδειξη ανάπτυξης |
|----------------------------|---|---|---|---|----|----|---|
| | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | |
| A. | K | K | K | M | M | M | Τυπικό πρότυπο ανάπτυξης. Το τελικό σημείο MIC είναι 8 µg/ml. |
| B. | K | K | K | K | K | K | Ανάπτυξη σε όλες τις υποδοχές. Το τελικό σημείο MIC είναι >32 µg/ml. |
| C. | M | M | M | M | M | M | Απουσία ανάπτυξης σε οποιαδήποτε υποδοχή. Το τελικό σημείο MIC είναι ≤1 µg/ml. |
| D. | K | K | K | M | K | K | «Υποδοχή που έχει παραλειφθεί». Το τελικό σημείο MIC είναι >32 µg/ml. Μη λάβετε υπόψη σας την «παραλείψη» όταν οι υποδοχές και στις δύο πλευρές παρουσιάζουν ανάπτυξη. Εάν παρουσιαστούν περισσότερες από μία «παραλείψεις» σε μία στήλη, τα αποτελέσματα των δοκιμασιών ακυρώνονται ¹ |
| E. | K | K | M | M | K | K | Διπλή «υποδοχή που έχει παραλειφθεί». Η δοκιμή θα πρέπει να επαναληφθεί ¹ |

¹ Με προσεκτικές τεχνικές, αυτές οι περιπτώσεις δεν είναι συχνές.

Σημειώσεις για την ανάγνωση

Αμφοτερικίνη Β.

Για την αμφοτερικίνη Β στις 24 ώρες, τα τελικά σημεία καθορίζονται συνήθως ευκολότερα και η MIC διαβάζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του φαρμάκου που αποτρέπει τυχόν ορατή αλλαγή του χρώματος. Τελικά σημεία σταδιακής μείωσης της ανάπτυξης δεν απαντώνται συνήθως με την αμφοτερικίνη Β.

Η πρώτη υποδοχή που εμφανίζει μια διακριτή αλλαγή χρώματος σε σύγκριση με τη θετική υποδοχή ανάπτυξης είναι η MIC.



Φλουκυτοσίνη και αντιμυκητιασικά τύπου αζολών

Τα *Candida albicans*, *C. glabrata* και *C. tropicalis* με φλουκυτοσίνη και αζόλες, όπως η φλουκοναζόλη, η ιτρακοναζόλη, η κετοκοναζόλη, η βορικοναζόλη και η ποσακοναζόλη μπορεί να δώσουν τελικά σημεία που είναι, κατά κανόνα, λιγότερο έντονα, λόγω σταδιακά μειούμενης ανάπτυξης και μπορεί να αποτελούν σημαντική πηγή διακύμανσης. Η σταδιακή μείωση της ανάπτυξης παρουσιάζεται όταν μια ελαφριά αλλαγή του χρώματος επιμένει και είναι συχνά πανομοιότυπη για όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου που είναι υψηλότερες από τη MIC. Η MIC θα πρέπει να διαβάζεται ως η πρώτη υποδοχή που εμφανίζει μια λιγότερο έντονη αλλαγή του χρώματος σε σύγκριση με την υποδοχή ελέγχου θετικής ανάπτυξης. Τα στελέχη αναφοράς καθορισμένης ευαισθησίας μπορεί επίσης να βοηθήσουν στην εκπαίδευση του προσωπικού. Τα απομονωμένα στελέχη *Candida krusei* θεωρούνται ότι είναι ενδογενώς ανθεκτικά στη φλουκοναζόλη και οι MIC τους δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται, (1) ένα σχόλιο θα πρέπει να συνοδεύει το αποτέλεσμα της δοκιμασίας που αναφέρεται.

Τελικό σημείο σταδιακής μείωσης της ανάπτυξης: Αυτό συμβαίνει όταν η ελάχιστη αλλαγή του χρώματος επιμένει και το χρώμα είναι συχνά πανομοιότυπο σε αρκετές συγκεντρώσεις. Η MIC θα πρέπει να διαβάζεται ως η πρώτη υποδοχή που εμφανίζει μια λιγότερο έντονη αλλαγή του χρώματος σε σύγκριση με την υποδοχή ελέγχου θετικής ανάπτυξης.



Εχινοκανδίνες

Τα τελικά σημεία MIC θα πρέπει να προσδιορίζονται μετά τις 24 ώρες επώασης στους 35 °C. Η MIC θα πρέπει να διαβάζεται ως η πρώτη υποδοχή που εμφανίζει μια λιγότερο έντονη αλλαγή του χρώματος σε σύγκριση με τη θετική υποδοχή ελέγχου.



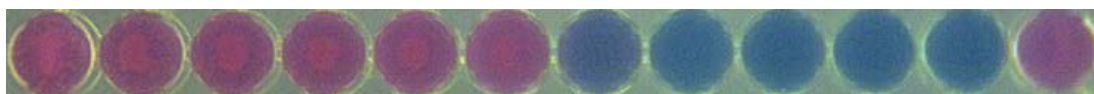
Ιτρακοναζόλη

Το διάλυμα ιτρακοναζόλης μπορεί περιστασιακά να εξαντληθεί, σε συγκεντρώσεις ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$. Αυτό μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση ανάπτυξης στην προσβεβλημένη υποδοχή και εμφάνιση κόκκινου χρώματος.



Περιοδικά, απαντάται παράδοξη ανάπτυξη στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ιτρακοναζόλης στις ομάδες εξετάσεων Sensititre YeastOne, κάτι που μπορεί να προκαλέσει εμφάνιση ροζ χρώματος σε αυτές τις υποδοχές.

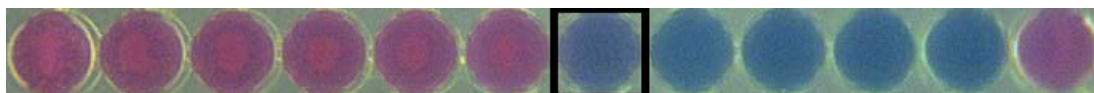
Το παράδοξο φαινόμενο, που είναι επίσης γνωστό ως φαινόμενο Eagle, αναφέρεται σε μια παρατήρηση όπου η αύξηση της συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού πέραν ενός συγκεκριμένου σημείου προκαλεί, παράδοξα, αύξηση του αριθμού των βακτηρίων που επιβιώνουν. Μια εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί είναι ότι επειδή η συγκέντρωση είναι πολύ υψηλή, ο παράγοντας μπορεί να ανταγωνίζεται ο ίδιος τον υποδοχέα στον οποίο προσδένεται (πρωτεΐνες πρόσδεσης πενικιλίνης, για παράδειγμα, στην περίπτωση μιας πενικιλίνης).



0,008 0,015 0,03 0,06 0,12 0,25 0,5 1 2 4 8 16

Επίλυση

Η ανάπτυξη στην υψηλή συγκέντρωση θα μπορούσε να αγνοηθεί, εκτός εάν υπάρχει ανάπτυξη σε όλες τις άλλες συγκεντρώσεις ιτρακοναζόλης. Στο παρακάτω παράδειγμα, η υποδοχή 0,5 $\mu\text{g/ml}$ που επισημαίνεται με το μαύρο τετράγωνο είναι όπου θα πρέπει να καταγράφεται το αποτέλεσμα MIC.



0,008 0,015 0,03 0,06 0,12 0,25 0,5 1 2 4 8 16

Εάν έχετε οποιοσδήποτε άλλες ερωτήσεις ή ανησυχίες, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης στον αριθμό τηλεφώνου: +44 (0) 1256 694287 | Φαξ: +44 (0) 1256 463388 ή ανατρέξτε στη σελίδα 12 για λίστα των διευθύνσεων ηλεκτρονικού ταχυδρομείου.

Μόλυνση/Παραλείψεις

Εναλλακτικά, μια ροζ (ανάπτυξη) υποδοχή ανάμεσα σε μπλε (απουσία ανάπτυξης) υποδοχές θα μπορούσαν να είναι ενδεικτικές μόλυνσης. Κάντε ανακαλλιέργεια των περιεχομένων των υποδοχών για να επιβεβαιώσετε την αιτία.

Μια μπλε υποδοχή σε μια σειρά κόκκινων υποδοχών ανάπτυξης υποδεικνύει μια «παραλείψη» και θα πρέπει να αγνοείται. Η MIC θα πρέπει να διαβάζεται πάνω από τυχόν υποδοχές που έχουν παραλειφθεί. Εάν υπάρχουν περισσότερες από μία υποδοχές που έχουν παραλειφθεί, το αντιμυκητιασικό δεν θα πρέπει να αναφέρεται.

Ποιοτικός έλεγχος

Η συχνότητα των δοκιμασιών ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τις τοπικές κατευθυντήριες οδηγίες¹

Το ενοφθαλμισμα θα πρέπει να καλλιεργείται σε κατάλληλο μέσο για να ελέγχεται η καθαρότητα. Τα αποτελέσματα της δοκιμής είναι άκυρα εάν ανιχνευτεί μικτή καλλιέργεια.

Όλες οι πλάκες Sensititre περιλαμβάνουν θετικές υποδοχές ελέγχου. Οι δοκιμασίες είναι άκυρες εάν δεν υπάρχει διακριτή ανάπτυξη σε όλες τις θετικές υποδοχές ελέγχου

Οι παρακάτω καλλιέργειες από την American Type Culture Collection (ATCC™) συνιστώνται για ποιοτικό έλεγχο από τον χρήστη:

Issatchenkia orientalis (Candida krusei) ATCC 6258

Candida parapsilosis ATCC 22019

Τα αποτελέσματα **δεν** θα πρέπει να αναφέρονται εάν τα αποτελέσματα ποιοτικού ελέγχου δεν βρίσκονται εντός εύρους.

Οι αναμενόμενες τιμές ποιοτικού ελέγχου παρέχονται στο CLSI M27. Για τον *Aspergillus*, ανατρέξτε στο έγγραφο καθοδήγησης M38.

Για τον ενοφθαλμισμό, την ανάγνωση και την ερμηνεία των πλακών ευαισθησίας Sensititre YeastOne κατά την εκτέλεση δοκιμής ποιοτικού ελέγχου από τον χρήστη, ακολουθείτε τις οδηγίες της προηγούμενης ενότητας.

Πίνακας 2. Συνιστώμενα όρια ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) 24 και 48 ωρών για δύο στελέχη ποιοτικού ελέγχου σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του εγγράφου M27 του CLSI για τον έλεγχο της μικροαραίωσης σε υγρό θρεπτικό μέσο (μέθοδος αναφοράς 2). Τα όρια που διαφέρουν ή παρατίθενται επιπρόσθετα προς τα δημοσιευμένα όρια ποιοτικού ελέγχου εμφανίζονται υπογραμμισμένα.

| Αντιμυκητιασικός παράγοντας | <i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC 6258 | | <i>Candida parapsilopsis</i> ATCC 22019 | |
|-----------------------------|--|------------|---|-------------|
| | 24 ώρες | 48 ώρες | 24 ώρες | 48 ώρες |
| 5 – Φλουκυτοσίνη | 4 – 16 | 8-32 | <u>0,12 – 0,5</u> | 0,12 – 0,5 |
| Αμφοτερικίνη Β | 0,5 – 2 | 1 – 4 | 0,25 – 2 | 0,5 – 4 |
| Ανιδουλαφουνγκίν | 0,03 – 0,12 | – | 0,25 – 2 | – |
| Κασποφουνγκίνη | 0,12 – 1 | 0,25 – 1 | 0,25 – 1 | 0,5 – 4 |
| Φλουκοναζόλη | 8 – 64 | 16 – 128 | 0,5 – 4 | 2 – 8 |
| Ιτρακοναζόλη | 0,12 – 1 | 0,25 – 1 | 0,06 – 0,5 | 0,12 – 0,5 |
| Μικαφουγκίνη | 0,06 – 0,5* | 0,12 – 0,5 | 0,5 – 2 | 0,5 – 4 |
| Ποσακοναζόλη | 0,06 – 0,5 | 0,12 – 1 | 0,03 – 0,25 | 0,06 – 0,25 |
| Βορικοναζόλη | 0,06 – 0,5 | 0,12 – 1 | 0,015 – 0,12 | 0,03 – 0,25 |

*Sensititre εύρος

Τα απομονωμένα στελέχη *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*) θεωρείται ότι είναι ενδογενώς ανθεκτικά στη φλουконаζόλη και οι MIC τους δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται με χρήση αυτής της κλίμακας

ΣΗΜΕΙΩΣΗ 1: Εάν οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC) για τον *Candida* spp. μετρούνται χρησιμοποιώντας μια κλίμακα που αποδίδει αποτελέσματα που εμπίπτουν μεταξύ αυτών των κατηγοριών, η επόμενη υψηλότερη κατηγορία υπονοείται. Συνεπώς, ένα απομονωμένο στέλεχος με MIC φλουконаζόλης 12,5 µg/ml θα πρέπει να τοποθετείται στην κατηγορία S-DD.

Ανατρέξτε στο CLSI¹ για περισσότερες πληροφορίες που αφορούν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Περιορισμοί

1. Οι πλάκες Sensititre YeastOne προορίζονται για χρήση σε ζυμομύκητες χωρίς σύνθετες θρεπτικές ανάγκες, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Candida*, των ειδών *Cryptococcus*, των ειδών *Aspergillus* και διαφόρων ειδών ταχέως αναπτυσσόμενων ζυμομυκητών. Δεν προορίζονται για ζυμομύκητες με σύνθετες θρεπτικές ανάγκες ή βραδέως αναπτυσσόμενους ζυμομύκητες, όπως *ιστόπλασμα* ή *βλαστομύκητες* και νηματώδεις μύκητες.
2. Αξιολογήθηκε η σύγκριση μεταξύ του συστήματος Sensititre YeastOne στις 24 ώρες και της μεθόδου αναφοράς CLSI στις 48 ώρες. Ωστόσο, λόγω της δυσκολίας στη συσχέτιση των τελικών σημείων μικροοργανισμών με σταδιακή μείωση της ανάπτυξης (*C. albicans*) σε επώαση για 48 ώρες, παρατηρούνται υψηλά ποσοστά σφαλμάτων.
3. Οι δοκιμασίες μυκήτων και αντιμυκητιασικών παραγόντων είναι εγγενώς λιγότερο ακριβείς από τις δοκιμασίες βακτηρίων.
4. Μερικοί ερευνητές πιστεύουν ότι η 24ωρη ανάγνωση είναι πιο κατάλληλη από την 48ωρη ανάγνωση, λόγω του προβλήματος της σταδιακής μείωσης της ανάπτυξης με ορισμένα απομονωμένα στελέχη. Το επίσημο πρότυπο CLSI υποδεικνύει ότι οι

αναγνώσεις θα πρέπει να επιτυγχάνονται στις 48 ώρες. Μέχρι να συλλεχθούν και να αναλυθούν επαρκή δεδομένα, το ερώτημα που αφορά τον πιο κατάλληλο κλινικά χρόνο ανάγνωσης παραμένει αναπάντητο. Η αναφορά των αποτελεσμάτων θα πρέπει να υποδεικνύει σαφώς τους χρόνους ανάγνωσης.

5. Για πρόσθετη καθοδήγηση, ανατρέξτε στις ευαισθησίες των αντιμικροβιακών κατά CLSI για το πρότυπο M27 των ζυμομυκήτων, ενώ για τον *Aspergillus* ανατρέξτε στο M38.
6. Η αλλαγή του χρώματος αποτελεί ένδειξη του τελικού σημείου, όχι η θολερότητα. (Αυτό το γεγονός μετριάξει ορισμένους σημαντικούς προβληματισμούς όσον αφορά την ερμηνεία ορισμένων ειδών *Candida* λόγω της «σταδιακής μείωσης της ανάπτυξης». Η σταδιακή μείωση της ανάπτυξης παρατηρείται συχνότερα με άλλα απομονωμένα στελέχη, εκτός από αυτά του αίματος και άλλων στείρων σωματικών υγρών.)
7. Μη διαβάζετε τα αποτελέσματα στις 24 ώρες, εάν η υποδοχή ελέγχου δεν έχει γίνει τελείως θετική.
8. Η απόδοση της βορικοναζόλης με είδη *Cryptococcus* και είδη ταχέως αναπτυσσόμενων ζυμομυκητών δεν έχει καθοριστεί. Συνεπώς, οι MIC της βορικοναζόλης θα πρέπει να αναφέρονται μόνο για είδη *Candida*.
9. Χρησιμοποιείτε μόνο με εγκεκριμένο για το σύστημα Sensititre ζυμό ενοφθαλμίσματος ευαισθησίας ζυμομυκήτων. Η χρήση άλλων ζυμών θα μπορούσε να προκαλέσει σφάλμα.
10. Όπως ισχύει με οποιαδήποτε in-vitro μέθοδο δοκιμασίας ευαισθησίας, τα αποτελέσματα της δοκιμασίας θα πρέπει να συσχετίζονται με την κλινική ανταπόκριση του ασθενούς στη συνταγογραφημένη θεραπεία.
11. Η απόδοση έχει τεκμηριωθεί μόνο για την αμφοτερικίνη B, την ιτρακοναζόλη, την ποσακοναζόλη και τη βορικοναζόλη με είδη *Aspergillus*.
12. Η βιβλιογραφική αναφορά 5 κατέδειξε υψηλό επίπεδο (>99% συμφωνία) με τη μέθοδο CLSI για την αμφοτερικίνη B και τα είδη *Aspergillus*. Χαμηλότερα ποσοστά συμφωνίας παρατηρήθηκαν με την ιτρακοναζόλη, οι *A. fumigatus*, *A. flavus* και *A. terreus* παρουσίασαν >90% συμφωνία, ενώ ο *A. nidulans* παρουσίασε 85% και ο *A. ustus* 33% συμφωνία, σε ομάδες εξετάσεων που επώαστηκαν για 48 ώρες με ενοφθαλμισμό 10^3 cfu/ml. Συμφωνία πάνω από 90% παρατηρήθηκε με ενοφθαλμισμό 10^4 cfu/ml και 72 ώρες επώασης με ιτρακοναζόλη και αμφοτερικίνη B (M38).
13. Η συσχέτιση της MIC για την κασποφουγκίνη με την έκβαση της θεραπείας, μετά τη χρήση κασποφουγκίνης, δεν έχει τεκμηριωθεί πλήρως. (9)
14. Η απόδοση του συστήματος Sensititre YeastOne με την ανιντουλαφουγκίνη, την κασποφουγκίνη και τη μिकाφουγκίνη με τα είδη *Cryptococcus*, *Aspergillus* και είδη ταχέως αναπτυσσόμενων ζυμομυκητών **εκτός από τα είδη *Candida*** δεν έχει τεκμηριωθεί. Συνεπώς, οι MIC για την ανιντουλαφουγκίνη, την κασποφουγκίνη και τη μिकाφουγκίνη θα πρέπει να αναφέρονται μόνο για τα είδη *Candida*.
15. Η απόδοση της πλάκας Sensititre YeastOne με την ποσεκοναζόλη με *Cryptococcus* δεν έχει τεκμηριωθεί.
16. Μόνο εργαλεία που υποστηρίζονται από το σύστημα Sensititre, δηλαδή ένα απλό σύστημα προβολής με κάτοπτρα, το Sensititre Vizion, πρέπει να χρησιμοποιούνται για την αναφορά των αποτελεσμάτων με προϊόντα που έχουν εγκριθεί κατά CE IVD και FDA. Οποιοδήποτε άλλο σύστημα δεν θα υποστηρίζεται.

Απόδοση

Οι ομάδες εξετάσεων που διαβάζονται μη αυτόματα έχουν σχεδιαστεί για να παρέχουν συγκρίσιμη απόδοση με τη διαδικασία μικροαραιώσεων σε ζυμό αναφοράς του CLSI. Ως συγκρίσιμη ορίζεται η

απόδοση με $\geq 90\%$ βασική και κατηγορική συμφωνία ως προς την αραίωση διπλασιασμού της MIC αναφοράς (1).

Βιβλιογραφία

- (1) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087 (M27).
- (2) Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Messer, S.A., Knapp, C.C., Killian, S., Norris, H.A., Ghannoun M.A. (1999). Multicentre comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric Antifungal Plate with the NCCLS, M27-A Reference Method for Testing Clinical Isolates of Common and Emerging *Candida* spp., and other Yeasts and Yeast-like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**: 591-595.
- (3) Espinel-Ingroff, A., Knapp, C.C., Holliday, N., Killian, S. (2002). Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel for testing voriconazole against Isolates of *Candida* spp., a comparison with the NCCLS M27-A microdilution reference method. *Clinical Microbiology and Infection*. **8**: Suppl 1. Abstract 0125.
- (4) Davey, K.G., Szekely, A., Johnson, E.M., Warnock, D.W., (1998). Comparison of a new commercial colorimetric microdilution method with a standard method for in-vitro susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **42**: 439-444.
- (5) Meletiadis, J., Moutin, J.W., Meis, F.G.M., Bouman, B.A., Verweij, P.E., and EuroFung Network. (2002). Comparison of the E Test and the Sensititre® Colorimetric Methods with the NCCLS, Proposed Standard for Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**: 2876-2885.
- (6) Espinel-Ingroff, A., *etal.* (1997). Multicenter Evaluation of Proposed Standardized Procedure for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**: 139-143.
- (7) Pemán, J., *etal.* (2001). Comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric method against reference M38-P for testing susceptibility of *Aspergillus* to Amphotericin B and Itraconazole. *Clinical Microbiology and Infection*, **7**: Suppl. 1. Abstract P694.
- (8) Linares, M., J., G. Charriel, F. Solís, F. Rodriguez, A. Ibarra and M. Casal. (2005) Susceptibility of filamentous fungi to voriconazole tested by two microdilution methods. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: 250-253
- (9) Kartsonis, N., *etal.* (2005). Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 3616-3623

- (10) Pfaller, M, A., *etal.* (2004) Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of five antifungal agents against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **50** :113-117
- (11) Pfaller, M, A., A. Espinel-Ingroff and R.N. Jones. (2004) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne® antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posiconazole and ravuconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 4577-4580
- (12) Espinel-Ingroff, A., *etal.* (2004) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel with the NCCLS, M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 718- 721
- (13) Linares, M, J., G. Charriel, F. Solís and M. Casal. (2004). Comparison of two microdilution methods for testing susceptibility of *Candida* spp. to voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 899-902
- (14) Espinel-Ingroff, A., M. Pfaller, S.A. Messer, C.C. Knapp, S. Killian, H.A. Norris, and M.A. Ghannoum. (1999) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other Yeasts and Yeast-Like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 591-595
- (15) Barry, A.L., M.A. Pfaller, S.D. Brown, A. Espinel-Ingroff, M.A. Ghannoum, C.c. Knapp, R.P. Rennie, J.H. Rex, and M.G. Rinaldi. (2000) Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3457-3459
- (16) Canton, E., *etal* (2005) .Sensititre YeastOne® Caspofungin susceptibility testing of *Candida* clinical isolates: Correlation with results of NCCLS, M27-A2 multicenter study . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 1604 -1607
- (17) Holliday, N.M., *etal* (2007) A reproducibility study with two echinocandins using the Sensititre YeastOne® susceptibility plate. *American Microbiology Abstract* **C-191**
- (18) Torres-Nabona, M., J. Guinea, J.Martinez_Alarcon, T. Pelaez, and E. Bouza. (2007) *In Vitro* activities of amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole against 45 clinical isolates of Zygomycetes: Comparison of NCCLS, M38-A , Sensititre YeastOne® and the Etest. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 1126 -1129
- (19) Espinel-Ingroff, A. (2006) Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing Zygomycetes, *Aspergillus* spp, *Candida* spp, and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and Amphotericin B. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 3616-3622
- (20) Patel, R., C. Mendrick, C.C. Knapp, R. Grist, and P.M. McNicholas. (2007) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne® plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posaconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2000-2001

(21) Alexander, B. D., T.C. Byrne, K.L. Smith, K.E. Hansen, K.J. Anstrom, J.R. Perfect and L. B. Reller. (2007) Comparative evaluation of Etest and Sensititre YeastOne® panels against the Clinical Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 698-706

(22). Patel, R., *etal.* (2007). Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posiconazole. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**: 2000-2001


ΑΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΥΘΥΝΩΝ

Οι πληροφορίες που παρέχονται σε αυτό το τεχνικό ένθετο ισχύουν κατά τον χρόνο της εκτύπωσης και μπορεί να αλλάξουν χωρίς προειδοποίηση.

Μπορείτε να λάβετε τις πιο πρόσφατες πληροφορίες από τη διεύθυνση www.trekds.com/techinfo ή εάν επικοινωνήσετε με τις τεχνικές υπηρεσίες μικροβιολογίας της Thermo Fisher Scientific.



Κατασκευάζεται από την TREK Diagnostic Systems (Τμήμα της Thermo Fisher Scientific Inc)
Units 17-19 Birches Industrial Estate, East Grinstead,
West Sussex. RH19 1XZ, Ηνωμένο Βασίλειο.
Τηλ.: +44- 1342-318777

 Το έμβλημα ATCC Licensed Derivative®, το λογότυπο ATCC Licensed Derivative® και τα σήματα καταλόγου ATCC είναι εμπορικά σήματα της ATCC. Η Thermo Fisher Scientific Inc. έχει λάβει άδεια χρήσης αυτών των εμπορικών σημάτων και άδεια πώλησης προϊόντων που προέρχονται από καλλιέργειες της ATCC®.

© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. Η ονομασία ATCC είναι εμπορικό σήμα της ATCC. Όλα τα εμπορικά σήματα αποτελούν ιδιοκτησία της Thermo Fisher Scientific Inc. και των θυγατρικών εταιρειών της.



Διευθύνσεις ηλεκτρονικού ταχυδρομείου τεχνικής υποστήριξης

| | |
|--|---|
| Αυστρία | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Βέλγιο | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| Δημοκρατία της Τσεχίας | mikrobiologie.tech.podpora.cz@thermofisher.com |
| Δανία | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Γαλλία | microbiologie.techsupport.fr@thermofisher.com |
| Φινλανδία | mikrobiologia.tekninentuki.fi@thermofisher.com |
| Γερμανία | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Ιταλία | microbiologia.supportotecnico.it@thermofisher.com |
| Ολλανδία | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| Νορβηγία | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Ισπανία | microbiologia.soporte.es@thermofisher.com |
| Σουηδία | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Τεχνική υποστήριξη στο Ηνωμένο Βασίλειο | microbiology.techsupport.uk@thermofisher.com |

Mode d'emploi

***Plaques pour antibiogramme Thermo Scientific
Sensititre YeastOne***

| |
|---|
| 029-YEAST – ROW-IVD CID9708 |
| Date de révision : Le 12 Juin 2017 |

PLAQUES POUR ANTIBIOGRAMME THERMO SCIENTIFIC SENSITITRE YEASTONE

Pour diagnostic *in vitro*

Pour obtenir plus d'informations, notamment sur la disposition de la plaque et les plages de CQ, veuillez consulter l'adresse www.trekds.com/techinfo. Le code de la plaque et le numéro de lot sont requis.

Utilisation prévue

La plaque pour antibiogramme Thermo Scientific™ Sensititre™ YeastOne™ est une méthode de diagnostic *in vitro* par microdilution en bouillon sur un format de microplaque sèche de 96 puits qui fournit des résultats quantitatifs de concentration minimale inhibitrice (CMI) pour les levures non exigeantes, notamment les espèces de *Candida*, de *Cryptococcus*, d'*Aspergillus* et diverses autres espèces de levures à croissance rapide.

Principes d'utilisation

Sensititre YeastOne est un test colorimétrique de microdilution en bouillon. Chaque microplaque contient les antifongiques aux dilutions appropriées et un indicateur colorimétrique.

Les résultats sont lus manuellement en observant la plus faible concentration d'antifongique qui ne présente aucune croissance (mise en évidence par l'absence de changement de couleur).

Précautions

Les résultats doivent être utilisés comme une aide à la sélection du médicament de choix pour le traitement.

Le système doit être utilisé uniquement par du personnel formé.

Il convient d'utiliser des méthodes appropriées de manipulation et d'élimination des organismes.

Stockage et durée de conservation

Les plaques doivent être stockées à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C) à l'abri de la lumière directe du soleil et de la chaleur directe. Chaque plaque est emballée dans un sachet avec un dessiccant en gel de silice. Ne pas utiliser la plaque ou le bouillon si (1) le dessiccant n'est pas de couleur orange, (2) la date de préemption est dépassée ou (3) le sachet est endommagé.

Matériaux

Éléments inclus :

Plaque Sensititre YeastOne

Film adhésif

Éléments non inclus [code produit] :

Eau déminéralisée Thermo Scientific™ Sensititre™ [T3339]

Bouillon Sensititre YeastOne [Y3462]

Têtes de dosage Thermo Scientific™ Sensititre™ (à utiliser avec le système automatisé d'inoculation Thermo Scientific™ Sensititre™ AIM™) [E3010]

Système Sensititre AIM [V3020]

Système d'affichage numérique de la CMI Thermo Scientific™ Sensititre™ Vizion™ [V2021]

Néphélomètre Thermo Scientific™ Sensititre™ [V3011]

Visionneuse manuelle [V4007]

Étalon de turbidité à 0,5 McFarland [E1041]

Anse bactériologique

Pipette de 20 µl

Réservoir stérile d'inoculum

Pipettes de 100 µl et embouts jetables

Souches de contrôle qualité

Boîtes de milieu gélosé pour croissance fongique, par ex., gélose de Sabouraud au dextrose (Sabouraud Dextrose Agar, SDA)

Incubateur à 34–36 °C, sans CO₂

Agitateur vortex

Matériels supplémentaires requis pour l'analyse d'*Aspergillus* spp.

Gélose de Takashio ou gélose dextrosée à la pomme de terre

Écouvillon en coton

Sérum physiologique stérile avec 0,05 % de Tween™ 20

Prélèvement et préparation des échantillons

Les échantillons doivent être prélevés, transportés, stockés et mis en culture sur milieu gélosé d'isolement primaire à l'aide des procédures classiques¹.

Sélection du bouillon d'antibiogramme

Les performances des bouillons approuvés pour le système Sensititre sont testées pour une utilisation avec le système Sensititre.

Procédure d'inoculation (analyse de *Candida* et *Cryptococcus* spp.)

Laisser tous les bouillons revenir à température ambiante avant utilisation.

Les plaques doivent être inoculées dans les 5 heures suivant leur retrait du sachet. Il est recommandé d'utiliser une densité finale en organismes d'environ $1,5 \text{ à } 8 \times 10^3$ UFC/ml

Les étapes 1 et 2 doivent être terminées en 15 minutes.

1. Prélever plusieurs colonies bien isolées d'un diamètre > 1 mm sur une culture pure de 24 heures (gélose de Sabouraud au dextrose) de l'isolat de levure et les émulsifier dans de l'eau déminéralisée. Bien mélanger en s'assurant que la suspension est homogène, vortexer, si nécessaire. En cas de présence d'agrégats, laisser la suspension se déposer avant d'ajuster la densité. Ajuster visuellement sur l'étalon à 0,5 McFarland ou à l'aide d'un néphélomètre Sensititre
2. Transférer 20 μl de la suspension dans 11 ml de bouillon Sensititre YeastOne pour obtenir un inoculum final de $1,5 \text{ à } 8 \times 10^3$ UFC/ml.
3. Transférer 100 μl de la suspension finale sur la plaque Sensititre YeastOne dans les 15 minutes suivant la réalisation de l'étape 2 en utilisant soit :
 - a. **Le système Sensititre AIM** – Remplacer le bouchon du tube par une tête de dosage à usage unique Sensititre et inoculer la plaque conformément au mode d'emploi du Sensititre AIM. Retirer le tube de test associé à la tête de dosage du système Sensititre AIM dans les 30 secondes suivant l'inoculation d'une plaque et le stocker à l'envers sur un support ou le jeter
 - b. **Une pipette manuelle** – Verser le bouillon dans une cuve d'ensemencement stérile et inoculer la plaque à l'aide d'une pipette appropriée
4. Vérifier la numération des colonies en prélevant 10 μl du puits de contrôle positif et en l'étalant sur une gélose de Sabouraud au dextrose (Sabouraud Dextrose Agar, SDA). Un inoculum correct produira 10 à 80 colonies
5. Recouvrir tous les puits avec le film adhésif. Éviter les plis pour empêcher les sauts de puits

Procédure d'inoculation (analyse d'*Aspergillus* spp.)^{5-7, 22}

Laisser tous les bouillons revenir à température ambiante avant utilisation.

Les plaques doivent être inoculées dans les 5 heures suivant leur retrait du sachet.

Il est recommandé d'utiliser une densité finale en organismes d'environ $0,5 \text{ à } 5 \times 10^4$ UFC/ml.

1. Sous-culture à partir d'une gélose de Sabouraud au dextrose ou d'une gélose glucosée à la pomme de terre.
2. Incuber pendant 7 jours à 35°C pour obtenir une sporulation adéquate.
3. Recueillir les conidies à l'aide d'un écouvillon en coton et les mettre en suspension dans une solution physiologique stérile avec du TweenTM. Laisser les particules lourdes se déposer pendant 3 à 5 minutes.
4. Recueillir le surnageant et le mélanger avec un agitateur à vortex.

5. Ajuster la turbidité du surnageant à 80 % à 82 % de transmittance à 530 nm mesurée avec un spectrophotomètre, ce qui équivaut à un inoculum de $0,6$ à 5×10^6 UFC/ml. Sinon, ajuster sur un étalon à 0,5 McFarland.
6. Ajouter 100 µl de la suspension dans 11 ml de bouillon Sensititre YeastOne pour obtenir un inoculum final de $0,5$ à 5×10^4 UFC/ml.
7. Transférer 100 µl de la suspension finale sur la plaque Sensititre YeastOne dans les 15 minutes suivant la réalisation de l'étape 2 en utilisant soit :

a. Le système Sensititre AIM.

Remplacer le bouchon du tube par une tête de dosage à usage unique Sensititre et inoculer la plaque conformément au mode d'emploi du Sensititre AIM.

Retirer le tube de test associé à la tête de dosage du système Sensititre AIM dans les 30 secondes suivant l'inoculation d'une plaque et le stocker à l'envers sur un support ou le jeter.

b. Une pipette manuelle. Verser le bouillon dans une cuve d'ensemencement stérile et inoculer la plaque à l'aide d'une pipette appropriée.

8. Vérifier la numération en colonies en prélevant 10 µl de l'inoculum dans le puits de contrôle positif et en étalant l'inoculum sur une gélose de Sabouraud au dextrose (SDA). Un inoculum correct produira 50 à 500 colonies.
9. Recouvrir tous les puits avec un film adhésif. Éviter les plis pour empêcher les sauts de puits.

Incubation

Incuber les boîtes à 35 °C dans un incubateur sans CO₂.

Les températures d'incubation supérieures à 35 °C risquent d'affecter les performances.

- Les espèces de *Candida* doivent être incubées pendant 24 à 25 heures (consulter l'étape 1 de la section LECTURE DES RÉSULTATS DE TEST)
- Les espèces de *Cryptococcus* doivent être incubées pendant 72 heures.
- Les espèces d'*Aspergillus* doivent être incubées pendant 48 à 72 heures.

Lecture des résultats de test

Les plaques peuvent être lues visuellement sous l'éclairage normal du laboratoire à l'aide d'une visionneuse manuelle à miroir ou en utilisant le système Sensititre Vizion. Consulter le mode d'emploi du système Sensititre Vizion pour obtenir des informations supplémentaires. La croissance des levures dans les solutions d'antifongiques sera mise en évidence par un changement de l'indicateur colorimétrique de croissance qui passera du bleu (négatif) au rouge (positif). Certaines espèces de levure peuvent ne pas colorer complètement l'indicateur en rouge mais affichent plutôt une teinte violacée. Certains organismes peuvent présenter une coloration légèrement violacée avec le posaconazole, le voriconazole, le fluconazole, l'itraconazole et le kétoconazole.

1. Bien examiner le puits de croissance positive après l'incubation.

- a. Les espèces de *Candida* doivent être incubées pendant 24 à 25 heures (consulter l'étape 1 de la section LECTURE DES RÉSULTATS DE TEST)
 - b. Les espèces de *Cryptococcus* doivent être incubées pendant 72 heures
 - c. Les espèces d'*Aspergillus* doivent être incubées pendant 48 à 72 heures
2. Si le puits de croissance est rouge, les résultats des antifongiques peuvent être déterminés. Pour les espèces de *Candida*, si le puits est bleu ou violet pâle, réincuber pendant 24 heures supplémentaires et réexaminer.

NE PAS LIRE LA TURBIDITÉ DANS LA PLAQUE SENSITIVE YEASTONE. Lire uniquement le changement de couleur.

3. La CMI est la concentration la plus faible d'un antifongique permettant d'inhiber considérablement la croissance de l'organisme, détectée par un changement de couleur.

Interprétation des résultats

TABLEAU 1. Illustration et interprétation des résultats de test pouvant se produire

| Concentration dans le puits µg/ml | | | | | | | R = ROUGE : indication d'une croissance positive |
|-----------------------------------|---|---|---|---|----|----|---|
| | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | B = BLEU : indication d'une croissance négative |
| A. | R | R | R | B | B | B | Schéma typique de croissance ; le résultat de CMI est de 8 µg/ml. |
| B. | R | R | R | R | R | R | Croissance dans tous les puits ; le résultat de CMI est > 32 µg/ml. |
| C. | B | B | B | B | B | B | Croissance dans aucun des puits ; le résultat de CMI est ≤ 1 µg/ml. |
| D. | R | R | R | B | R | R | « Puits sauté ». Le résultat de CMI est > 32 µg/ml. Omettre le puits « sauté » quand les puits qui l'encadrent des deux côtés présentent une croissance. Si une colonne comporte plus d'un puits « sauté », les résultats du test sont invalidés ¹ |
| E. | R | R | B | B | R | R | Double « puits sauté ». Le test doit être répété ¹ |

¹ Le recours à des techniques soigneuses limite la fréquence de ces événements.

Remarques de lecture

Amphotéricine B.

Les résultats de l'amphotéricine B en 24 heures sont généralement facilement déterminés, et la CMI est identifiée comme étant la plus faible concentration en médicament qui empêche tout changement de couleur détectable. Les résultats de traîne ne sont pas fréquents avec l'amphotéricine B.

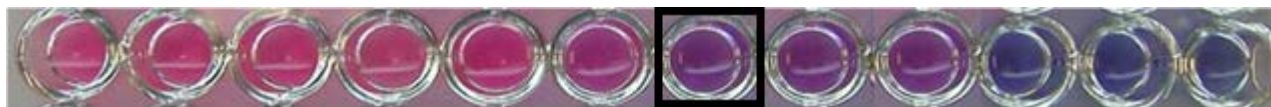
Le premier puits présentant un changement de couleur distinct par rapport au puits de croissance positive correspond à la CMI.



Flucytosine et antifongiques azolés

Candida albicans, *C. glabrata* et *C. tropicalis* peuvent produire des résultats habituellement moins nets pour la flucytosine et les azoles, tels que le fluconazole, l'itraconazole, le kétoconazole, le voriconazole et le posaconazole, en raison d'une traîne de croissance, qui peut constituer une importante source de variabilité. Le phénomène de traîne se produit quand un léger changement de couleur persiste, souvent identique à toutes les concentrations en médicament supérieures à la CMI. La CMI doit être interprétée comme étant le premier puits présentant un changement de couleur moins intense que celui du puits de contrôle positif de croissance. Les souches de référence présentant une sensibilité définie peuvent également aider à former le personnel. Les isolats de *Candida krusei* sont supposés être intrinsèquement résistants au fluconazole et leurs CMI ne doivent pas être interprétées, (1) un commentaire doit accompagner le résultat de test rendu.

Résultat de traîne : ceci se produit quand un léger changement de couleur persiste, souvent identique dans plusieurs concentrations. La CMI doit être interprétée comme étant le premier puits présentant un changement de couleur moins intense que celui du puits de contrôle positif de croissance.



Échinocandines

Les résultats de CMI doivent être déterminés après 24 heures d'incubation à 35 °C. La CMI doit être interprétée comme étant le premier puits présentant un changement de couleur moins intense que celui du puits de contrôle positif de croissance.



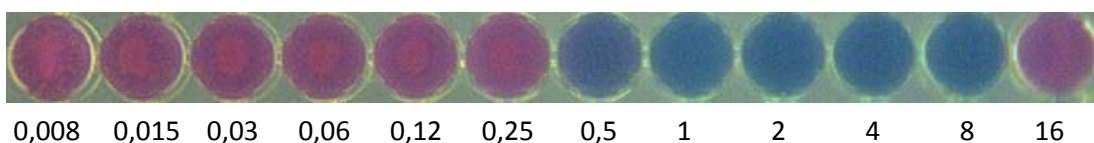
Itraconazole

L'itraconazole peut parfois disparaître de la solution à des concentrations $\geq 4 \mu\text{g/ml}$. Ceci peut conduire à une croissance visible dans le puits affecté qui vire au rouge.



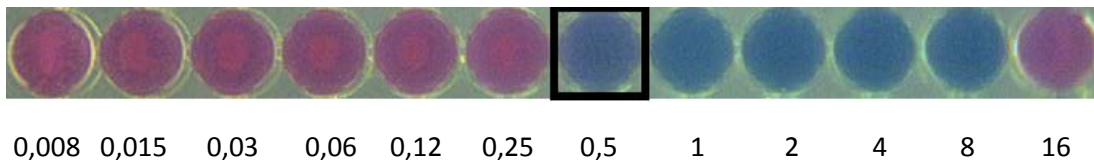
Parfois, une croissance paradoxale est observée aux concentrations plus élevées d'itraconazole sur les plaques Sensititre YeastOne, ce qui conduit à une coloration de ces puits en rose.

L'effet paradoxal, qui est également désigné par le terme de phénomène d'Eagle, se rapporte à une observation dans laquelle une augmentation de la concentration en antibiotique au-delà d'une certaine valeur résulte de manière paradoxale en une augmentation du nombre de bactéries survivantes. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait qu'en raison de la concentration trop élevée, la molécule pourrait auto-antagoniser le récepteur sur lequel elle se fixe (protéines de liaison des pénicillines par exemple dans le cas des pénicillines).



Résolution

La croissance dans le puits à concentration élevée doit être ignorée sauf si toutes les autres concentrations d'itraconazole présentent une croissance. Dans l'exemple ci-dessous, le puits à $0,5 \mu\text{g/ml}$ encadré d'un carré noir correspond au résultat de CMI à consigner.



Pour toute autre question ou préoccupation, veuillez contacter le service d'assistance technique par téléphone : +44 (0) 1256 694287 | Fax : +44 (0) 1256 463388 ou voir page 12 pour la liste des e-mails.

Contamination / Puits sautés

Un puits rose (croissance) entre des puits bleus (pas de croissance) pourrait par ailleurs être le signe d'une contamination. Réaliser une sous-culture du contenu du puits pour vérifier la cause. Un puits bleu dans une série de puits rouges indique un puits « sauté » et doit être ignoré. La CMI doit être supérieure à tout puits sauté. En présence de plus d'un puits sauté, l'antifongique ne doit pas être rapporté.

Contrôle qualité

La fréquence de l'analyse de contrôle qualité doit respecter les directives locales¹

L'inoculum doit être mis en culture sur un milieu adapté pour vérifier sa pureté. Les résultats de test sont non valides en cas de détection d'une culture mixte.

Toutes les plaques Sensititre contiennent des puits de contrôle positif. Les tests sont non valides sauf en présence d'une croissance distincte dans tous les puits de contrôle positif

Les cultures suivantes de l'American Type Culture Collection (ATCC[™]) sont recommandées pour le contrôle qualité par l'utilisateur :

Issatchenkia orientalis (*Candida krusei*) ATCC 6258

Candida parapsilosis ATCC 22019

Les résultats ne doivent **pas** être rendus si les résultats de CQ ne se situent pas dans la plage.

Lors des analyses du contrôle qualité de l'utilisateur, l'inoculation, la lecture et l'interprétation des plaques de sensibilité Sensititre YeastOne doivent être réalisées comme décrit dans la section précédente.

Tableau 2. Limites CMI de 24 et 48 heures recommandées pour deux souches de contrôle qualité conformément à la directive M27 du CLSI relative à la microdilution en bouillon (réf. 2). Les plages différentes ou en sus des plages du contrôle qualité publiées sont soulignées.

| Agent antifongique | <i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC 6258 | | <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 | |
|--------------------|---|-----------|---|-----------|
| | 24 heures | 48 heures | 24 heures | 48 heures |
| 5-fluorocytosine | 4-16 | 8-32 | <u>0,12-0,5</u> | 0,12-0,5 |
| Amphotéricine B | 0,5-2 | 1-4 | 0,25-2 | 0,5-4 |
| Aidulafungine | 0,03-0,12 | - | 0,25-2 | - |
| Caspofungine | 0,12-1 | 0,25-1 | 0,25-1 | 0,5-4 |
| Fluconazole | 8-64 | 16-128 | 0,5-4 | 2-8 |
| Itraconazole | 0,12-1 | 0,25-1 | 0,06-0,5 | 0,12-0,5 |
| Micafungine | 0,06-0,5* | 0,12-0,5 | 0,5-2 | 0,5-4 |
| Posaconazole | 0,06-0,5 | 0,12-1 | 0,03-0,25 | 0,06-0,25 |
| Voriconazole | 0,06-0,5 | 0,12-1 | 0,015-0,12 | 0,03-0,25 |

* Plages Sensititre

Les valeurs de CQ attendues sont précisées dans le document CLSI M27 ; pour *Aspergillus*, consulter le document de conseils M38.

Les isolats d'*Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*) sont supposés être intrinsèquement résistants au fluconazole et leurs CMI ne doivent pas être interprétées en utilisant cette échelle

REMARQUE 1 : si les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de *Candida* spp. sont mesurées à l'aide d'une échelle qui produit des résultats de répartition entre des catégories, la catégorie supérieure est sous-entendue. Ainsi, un isolat avec une CMI de 12,5 µg/ml pour le fluconazole doit être classé dans la catégorie S-DD.

Pour plus d'informations concernant l'interprétation des résultats, consulter le CLSI¹.

Limites

1. Les plaques Sensititre YeastOne doivent être utilisées pour les levures non exigeantes, notamment les espèces de *Candida*, les espèces de *Cryptococcus*, les espèces d'*Aspergillus* et diverses autres espèces de levure à croissance rapide. Elles ne sont pas destinées aux levures exigeantes ou à croissance lente telles que *Histoplasma* ou *Blastomyces* ni aux champignons filamenteux.
2. Le système Sensititre YeastOne en 24 heures a été comparé à la méthode de référence du CLSI en 48 heures. Cependant, en raison de la difficulté de corréler les résultats des organismes présentant une traîne (*C. albicans*) en 48 heures d'incubation, des taux d'erreur élevés ont été observés.
3. L'analyse des fungi et des molécules antifongiques est intrinsèquement moins précise que l'analyse des bactéries.
4. Certains investigateurs considèrent que la lecture en 24 heures est plus appropriée que celle en 48 heures en raison du problème de traîne observé avec certains isolats. La norme officielle du CLSI indique que les lectures doivent être réalisées en 48 heures. Tant qu'une quantité suffisante de données n'aura pas été recueillie et analysée, la question du moment le plus approprié pour la lecture ne sera pas résolue. Le rendu des résultats doit indiquer clairement le moment de la lecture.
5. Pour obtenir des conseils supplémentaires, consulter la norme M27 du CLSI sur la sensibilité des levures aux antifongiques, et pour *Aspergillus*, consulter la norme M38.
6. Le changement de couleur – et non pas la turbidité – est l'indicateur du résultat. (Ceci atténue des inquiétudes majeures concernant l'interprétation de certaines espèces de *Candida* en raison du phénomène de traîne. Le phénomène de traîne est plus souvent observé sur des isolats obtenus à partir de prélèvements autres que le sang et les liquides corporels stériles.)
7. Ne pas lire en 24 heures si le puits de contrôle n'est pas devenu entièrement positif.
8. La performance du voriconazole n'a pas été déterminée pour les espèces de *Cryptococcus* et de levures à croissance rapide. Les CMI du voriconazole ne doivent donc être rendues que pour les espèces de *Candida*.
9. Utiliser uniquement le bouillon d'inoculum pour antibiogramme de levure approuvé pour le système Sensititre. L'utilisation d'autres bouillons pourrait entraîner des erreurs.
10. Comme pour toute méthode d'antibiogramme in vitro, les résultats de l'analyse doivent être corrélés avec la réponse clinique du patient au traitement prescrit.

11. La performance de l'amphotéricine B, de l'itraconazole, du posaconazole et du voriconazole a été établie uniquement pour les espèces d'*Aspergillus*.
12. La référence 5 a montré un niveau élevé de concordance (> 99 %) de l'amphotéricine B avec la méthode du CLSI pour les espèces d'*Aspergillus*. Une concordance moins élevée a été observée pour l'itraconazole : *A. fumigatus*, *A. flavus* et *A. terreus* ont présenté une concordance > 90 % alors qu'*A. nidulans* a présenté une concordance de 85 % et *A. ustus* une concordance de 33 % sur des plaques incubées pendant 48 heures avec un inoculum de 10³ UFC/ml. Une concordance supérieure à 90 % de l'itraconazole et de l'amphotéricine B a été observée avec un inoculum de 10⁴ UFC/ml et une incubation de 72 heures (M38).
13. La corrélation entre la CMI de la caspofungine et le résultat thérapeutique après l'utilisation de la caspofungine n'a pas été entièrement établie (9).
14. La performance du système Sensititre YeastOne pour l'anidulafungine, la caspofungine et la micafungine n'a pas été établie sur les espèces de *Cryptococcus*, d'*Aspergillus* et de levures à croissance rapide **autres que les espèces de *Candida***. Les CMI de l'anidulafungine, de la caspofungine et de la micafungine ne doivent donc être rendues que pour les espèces de *Candida*.
15. La performance de la plaque Sensititre YeastOne pour le posaconazole n'a pas été établie sur *Cryptococcus*.
16. Seuls les instruments pris en charge par le système Sensititre, c'est-à-dire une simple visionneuse à miroir ou le Sensititre Vizion, doivent être utilisés pour rendre les résultats des produits Sensititre marqués CE IVD et approuvés par la FDA ; tout autre système utilisé ne sera pas pris en charge.

Performance

Les plaques lues manuellement sont conçues pour obtenir une performance comparable à la procédure de microdilution en bouillon de référence du CLSI. Une performance comparable se définit par une concordance essentielle et catégorique > 90 % dans la limite d'une dilution au demi de la CMI de référence (1).

Bibliographie

- (1) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087 (M27).
- (2) Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Messer, S.A., Knapp, C.C., Killian, S., Norris, H.A., Ghannoun M.A. (1999). Multicentre comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric Antifungal Plate with the NCCLS, M27-A Reference Method for Testing Clinical Isolates of Common and Emerging *Candida* spp., and other Yeasts and Yeast-like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**: 591-595.
- (3) Espinel-Ingroff, A., Knapp, C.C., Holliday, N., Killian, S. (2002). Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel for testing voriconazole against Isolates of *Candida* spp., a comparison with the NCCLS M27-A microdilution reference method. *Clinical Microbiology and Infection*. **8**: Suppl 1. Abstract 0125.

- (4) Davey, K.G., Szekely, A., Johnson, E.M., Warnock, D.W., (1998). Comparison of a new commercial colorimetric microdilution method with a standard method for in-vitro susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **42**: 439-444.
- (5) Meletiadiis, J., Moutin, J.W., Meis, F.G.M., Bouman, B.A., Verweij, P.E., and EuroFung Network. (2002). Comparison of the E Test and the Sensititre® Colorimetric Methods with the NCCLS, Proposed Standard for Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**: 2876-2885.
- (6) Espinel-Ingroff, A., *etal.* (1997). Multicenter Evaluation of Proposed Standardized Procedure for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**: 139-143.
- (7) Pemán, J., *etal.* (2001). Comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric method against reference M38-P for testing susceptibility of *Aspergillus* to Amphotericin B and Itraconazole. *Clinical Microbiology and Infection*, **7**: Suppl. 1. Abstract P694.
- (8) Linares, M., J., G. Charriel, F. Solís, F. Rodriguez, A. Ibarra and M. Casal. (2005) Susceptibility of filamentous fungi to voriconazole tested by two microdilution methods. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: 250-253
- (9) Kartsonis, N., *etal.* (2005). Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 3616-3623
- (10) Pfaller, M., A., *etal.* (2004) Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of five antifungal agents against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **50** :113-117
- (11) Pfaller, M., A., A. Espinel-Ingroff and R.N. Jones. (2004) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne® antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posiconazole and ravuconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 4577-4580
- (12) Espinel-Ingroff, A., *etal.* (2004) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel with the NCCLS, M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 718- 721
- (13) Linares, M., J., G. Charriel, F. Solís and M. Casal. (2004). Comparison of two microdilution methods for testing susceptibility of *Candida* spp. to voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 899-902
- (14) Espinel-Ingroff, A., M. Pfaller, S.A. Messer, C.C. Knapp, S. Killian, H.A. Norris, and M.A. Ghannoum. (1999) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other Yeasts and Yeast-Like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 591-595

- (15) Barry, A.L., M.A. Pfaller, S.D. Brown, A. Espinel-Ingroff, M.A. Ghannoum, C.c. Knapp, R.P. Rennie, J.H. Rex, and M.G. Rinaldi. (2000) Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3457-3459
- (16) Canton, E., *etal* (2005) .Sensititre YeastOne® Caspofungin susceptibility testing of *Candida* clinical isolates: Correlation with results of NCCLS, M27-A2 multicenter study . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 1604 -1607
- (17) Holliday, N.M., *etal* (2007) A reproducibility study with two echinocandins using the Sensititre YeastOne® susceptibility plate. *American Microbiology Abstract* **C-191**
- (18) Torres-Nabona, M., J. Guinea, J.Martinez_Alarcon, T. Pelaez, and E. Bouza. (2007) *In Vitro* activities of amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole against 45 clinical isolates of Zygomycetes: Comparison of NCCLS, M38-A , Sensititre YeastOne® and the Etest. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 1126 -1129
- (19) Espinel-Ingroff, A. (2006) Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing Zygomycetes, *Aspergillus* spp, *Candida* spp, and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and Amphotericin B. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 3616-3622
- (20) Patel, R., C. Mendrick, C.C. Knapp, R. Grist, and P.M. McNicholas. (2007) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne® plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posaconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2000-2001
- (21) Alexander, B. D., T.C. Byrne, K.L. Smith, K.E. Hansen, K.J. Anstrom, J.R. Perfect and L. B. Reller. (2007) Comparative evaluation of Etest and Sensititre YeastOne® panels against the Clinical Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 698-706
- (22). Patel, R., *etal*. (2007). Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posiconazole. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**: 2000-2001

CLAUDE DE NON-RESPONSABILITÉ

Les informations fournies dans cette notice technique sont à jour au moment de l'impression et peuvent évoluer sans préavis.

Les informations les plus récentes peuvent être téléchargées à l'adresse www.trekds.com/techinfo ou en contactant les services techniques en microbiologie de Thermo Fisher Scientific.



Fabriqué par TREK Diagnostic Systems (une entité de Thermo Fisher Scientific Inc)
Units 17-19 Birches Industrial Estate, East Grinstead,
West Sussex. RH19 1XZ, Royaume-Uni.
Tél : +44- 1342-318777



L'emblème ATCC Licensed Derivative®, le logo ATCC Licensed Derivative® et les marques ATCC sont des marques déposées d'ATCC. Thermo Fisher Scientific Inc. détient une licence lui permettant d'utiliser ces marques déposées et de vendre les produits dérivés des cultures ATCC®.

© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. Tous droits réservés. ATCC est une marque déposée de ATCC. Toutes les autres marques mentionnées sont la propriété de Thermo Fisher Scientific Inc. et de ses filiales.



Adresses e-mail de l'assistance technique

| | |
|--|---|
| Autriche | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Belgique | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| République Tchèque | mikrobiologie.tech.podpora.cz@thermofisher.com |
| Danemark | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| France | microbiologie.techsupport.fr@thermofisher.com |
| Finlande | mikrobiologia.tekninentuki.fi@thermofisher.com |
| Allemagne | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Italie | microbiologia.supportotecnico.it@thermofisher.com |
| Pays-Bas | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| Norvège | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Espagne | microbiologia.soporte.es@thermofisher.com |
| Suède | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Assistance technique au Royaume-Uni | microbiology.techsupport.uk@thermofisher.com |

Instrukcja użycia

***Płytki do oznaczania wrażliwości Thermo Scientific
Sensititre YeastOne***

| |
|-------------------------------------|
| 029-YEAST – ROW-IVD CID9708 |
| Data zmiany: 12 czerwca 2017 |

PŁYTKI DO OZNACZANIA WRAŻLIWOŚCI THERMO SCIENTIFIC SENSITITRE YEASTONE

Do badań diagnostycznych *in vitro*

Więcej informacji, w tym na temat układu płytki i zakresów KJ, można znaleźć na stronie www.trekds.com/techinfo. Wymagany jest kod płytki i numer partii.

Przeznaczenie

Płytki do oznaczania wrażliwości Thermo Scientific™ Sensititre™ YeastOne™ to zestaw do badań diagnostycznych *in vitro* wykorzystujący metodę mikrorozcieńczeń w bulionie w formie suszonej 96-dółkowej mikropłytki umożliwiający uzyskanie ilościowych wyników minimalnego stężenia hamującego (ang. minimum inhibitory concentration, MIC) dla niewymagających odżywczo drożdży, w tym gatunków z rodzajów *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* i różnych innych szybko rosnących gatunków drożdży.

Zasady użycia

Sensititre YeastOne to oznaczenie kolorymetryczne wykorzystujące metodę mikrorozcieńczeń w bulionie. Do każdej mikropłytki dozuje się leki przeciwgrzybicze w odpowiednich stężeniach i wskaźnik kolorymetryczny.

Wyniki odczytuje się ręcznie, sprawdzając najniższe stężenie leku przeciwgrzybiczego, które wykazuje brak wzrostu (na co wskazuje brak zmiany zabarwienia).

Środki ostrożności

Wyniki powinny stanowić pomoc w wyborze najlepszego leku do terapii.

System powinien obsługiwać wyłącznie przeszkolony personel.

Konieczne jest prawidłowe obchodzenie się z mikroorganizmami i stosowanie właściwych metod utylizacji.

Przechowywanie i okres trwałości

Płytki należy przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C), z dala od bezpośredniego działania promieni słonecznych i bezpośrednich źródeł ciepła. Każda płytka zapakowana jest w folię ze środkiem suszącym (krzemionką koloidalną). Nie wolno stosować płytki lub bulionu, jeśli: (1) kolor środka suszącego nie jest pomarańczowy, (2) upłynęła data ważności lub (3) opakowanie foliowe zostało uszkodzone.

Materiały

Dostarczane:

Płytki Sensititre YeastOne

Adhezyjna folia uszczelniająca

Niedostarczane [kod produktu]:

Woda demineralizowana Thermo Scientific™ Sensititre™ [T3339]

Bulion Sensititre YeastOne [Y3462]

Główce dozujące Thermo Scientific™ Sensititre™ (do stosowania z automatycznym systemem do inokulacji Thermo Scientific™ Sensititre™ AIM™) [E3010]

System Sensititre AIM [V3020]

Cyfrowy system do odczytywania MIC Thermo Scientific™ Sensititre™ Vizion™ [V2021]

Nefelometr Thermo Scientific™ Sensititre™ [V3011]

Przyrząd do odczytu ręcznego [V4007]

Standard mętności McFarland 0,5 [E1041]

Eza bakteriologiczna

Pipeta 20 µl

Jałowy pojemnik na inokulum

Pipeta 100 µl i jednorazowe końcówki

Szczepy do kontroli jakości

Płytki agarowe do hodowli grzybów, np. Sabauroud Dextrose Agar (SDA)

Inkubator zapewniający 34–36°C, bez atmosfery CO₂

Mieszadło wibracyjne

Dodatkowe materiały wymagane do oznaczeń *Aspergillus* spp.

Podłoże Takashio Agar lub Potato Dextrose Agar

Wymazówka

Jałowa sól fizjologiczna z dodatkiem roztworu Tween™ 20 0,05%

Pobieranie i przygotowanie próbek

Próbki należy pobierać, przenosić, przechowywać i nanosić na płytki z podstawowym podłożem do izolacji z wykorzystaniem standardowych procedur¹.

Wybór bulionu do oznaczenia wrażliwości

Buliony zatwierdzone do stosowania z systemem Sensititre zostały przetestowane pod kątem wydajności w przypadku ich używania z systemem Sensititre.

Procedura inokulacji (oznaczenia *Candida* i *Cryptococcus* spp.)

Przed użyciem odczekać, aż wszystkie buliony osiągną temperaturę pokojową.

Inokulacji płytek należy dokonać w ciągu 5 godzin od ich wyjęcia z foliowego opakowania. Zalecana jest ostateczna gęstość mikroorganizmów w zakresie $1,5\text{--}8 \times 10^3$ CFU/ml.

Etapy 1 i 2 należy ukończyć w ciągu 15 minut.

Wybrać kilka dobrze wyodrębnionych kolonii o średnicy > 1 mm z czystej 24-godzinnej hodowli izolatu drożdży (na podłożu Sabauroud Dextrose Agar) i dokonać jej emulgacji w wodzie demineralizowanej. Dokładnie wymieszać, w razie potrzeby w mieszadło wirowym, aby uzyskać jednorodną mieszaninę. Jeśli powstaną grudki, przed dostosowaniem gęstości należy odczekać, aż zawiesina osiadzie. Dostosować do standardu McFarland 0,5, oceniając wzrokowo lub za pomocą nefelometru Sensititre.

1. Przenieść 20 µl zawiesiny do 11 ml bulionu Sensititre YeastOne, aby uzyskać ostateczne inokulum $1,5\text{--}8 \times 10^3$ CFU/ml.
2. Przenieść 100 µl zawiesiny końcowej na płytkę Sensititre YeastOne w ciągu 15 minut od zakończenia etapu 2 za pomocą jednego z następujących dwóch sposobów:
 - a. **System Sensititre AIM** — zastąpić nasadkę probówki jednorazową głowicą dozującą Sensititre i dokonać inokulacji płytki zgodnie z podręcznikiem użytkownika systemu Sensititre AIM. Wyjąć próbkę wraz z głowicą dozującą z systemu Sensititre AIM w ciągu 30 sekund od inokulacji płytki i przechowywać odwróconą do góry dnem w statywie lub wyrzucić.
 - b. **Pipeta ręczna** — wlać bulion do jałowego pojemnika do inokulacji i dokonać inokulacji płytki za pomocą odpowiedniej pipety.
3. Sprawdzenie liczby kolonii należy przeprowadzić, pobierając 10 µl inokulum z dołka dodatniej kontroli wzrostu i nanosząc je na podłoże Sabauroud Dextrose Agar (SDA). Prawidłowo przygotowane inokulum doprowadzi do powstania 10–80 kolonii.
4. Zakryć wszystkie dołki folią uszczelniającą. Unikać zmarszczek, aby zapobiec powstaniu dołków do pominięcia.

Procedura inokulacji (badanie *Aspergillus* spp.)^{5–7, 22}

Przed użyciem odczekać, aż wszystkie buliony osiągną temperaturę pokojową.

Inokulacji płytek należy dokonać w ciągu 5 godzin od ich wyjęcia z foliowego opakowania.

Zalecana jest ostateczna gęstość mikroorganizmów w zakresie $0,5\text{--}5 \times 10^4$ CFU/ml.

1. Wykonać hodowlę pochodną, przenosząc próbkę z podłoża Sabouraud Dextrose Agar na podłoże Potato Dextrose Agar.
2. Inkubować przez 7 dni w temperaturze 35°C, aby uzyskać odpowiednią sporulację.
3. Zebrać konidia wymazówką i zawiesić w jałowej soli fizjologicznej z dodatkiem roztworu Tween™. Odczekać 3–5 minut, aż ciężkie cząstki osiadą na dnie.
4. Zebrać supernatant i wymieszać za pomocą mieszadła wibracyjnego.
5. Doprowadzić mętność do wartości transmitancji 80–82% przy 530 nm mierzonej za pomocą spektrofotometru, co odpowiada inokulum $0,6\text{--}5 \times 10^6$ CFU/ml. Ewentualnie dostosować do standardu McFarland 0,5.

6. Dodać 100 µl zawiesiny do 11 ml bulionu Sensititre YeastOne, aby uzyskać ostateczne inokulum $0,5-5 \times 10^4$ CFU/ml.
7. Przenieść 100 µl zawiesiny końcowej na płytkę Sensititre YeastOne w ciągu 15 minut od zakończenia etapu 2 za pomocą jednego z następujących dwóch sposobów:

a. System Sensititre AIM.

Zastąpić nasadkę probówki jednorazową głowicą dozującą Sensititre i dokonać inokulacji płytki zgodnie z podręcznikiem użytkownika systemu Sensititre AIM.

Wyjąć próbkówkę wraz z głowicą dozującą z systemu Sensititre AIM w ciągu 30 sekund od inokulacji płytki i przechowywać odwróconą do góry dnem w statywie lub wyrzucić.

b. Pipeta ręczna. Wlać bulion do jałowego pojemnika do inokulacji i dokonać inokulacji płytki za pomocą odpowiedniej pipety.

8. Sprawdzić liczbę kolonii, pobierając 10 µl inokulum z dołka dodatniej kontroli wzrostu i nanosząc je na podłoże Sabauroud Dextrose Agar (SDA). Prawidłowo przygotowane inokulum doprowadzi do powstania 50–500 kolonii.
9. Zakryć wszystkie dołki folią uszczelniającą. Unikać zmarszczek, aby zapobiec powstaniu dołków do pominięcia.

Inkubacja

Inkubować płytki w temperaturze 35°C w inkubatorze bez atmosfery CO₂.

Inkubacja w temperaturze powyżej 35°C może wpłynąć na wydajność.

- Drożdże gatunków z rodzaju *Candida* należy inkubować przez okres od 24 do 25 godzin (patrz etap 1 w rozdziale ODCZYTYWANIE WYNIKÓW OZNACZENIA).
- Drożdże gatunków z rodzaju *Cryptococcus* należy inkubować przez 72 godziny.
- Drożdże gatunków z rodzaju *Aspergillus* należy inkubować przez okres od 48 do 72 godzin.

Odczytywanie wyników oznaczenia

Płytki można odczytywać wzrokowo przy normalnym oświetleniu w laboratorium za pomocą przyrządu do odczytu ręcznego wykorzystującego lustro lub systemu Sensititre Vizion. Dodatkowe informacje można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu Sensititre Vizion. Wzrost drożdży w roztworach leków przeciwgrzybiczych będzie widoczny w postaci zmiany barwy kolorymetrycznego wskaźnika wzrostu z niebieskiego (wynik ujemny) na czerwony (wynik dodatni). Niektóre gatunki drożdży mogą nie powodować całkowitej zmiany barwy wskaźnika na czerwony, lecz dawać kolor bardziej zbliżony do fioletowego. Niektóre mikroorganizmy mogą powodować niewielkie fioletowe zabarwienie w przypadku pozakonazolu, worykonazolu, flukonazolu, itrakonazolu i ketokonazolu.

1. Po inkubacji sprawdzić dołek dodatniego wzrostu.
 - a. Drożdże gatunków z rodzaju *Candida* należy inkubować przez okres od 24 do 25 godzin (patrz etap 1 w rozdziale ODCZYTYWANIE WYNIKÓW OZNACZENIA).
 - b. Drożdże gatunków z rodzaju *Cryptococcus* należy inkubować przez 72 godziny.

- c. Drożdże gatunków z rodzaju *Aspergillus* należy inkubować przez okres od 48 do 72 godzin.
2. Jeśli dołek wykazuje wzrost powodujący zabarwienie na czerwono, można ustalić punkty końcowe dla leków przeciwgrzybiczych. W przypadku gatunków z rodzaju *Candida*, jeśli dołek jest niebieski lub lekko fioletowy, należy prowadzić inkubację przez kolejne 24 godziny i dokonać ponownego badania.

NIE NALEŻY ODCZYTYWAĆ ZMETNIENIA NA PŁYTCE SENSITITRE YEASTONE. Należy odczytywać wyłącznie zmianę koloru.

3. MIC to najniższe stężenie leku przeciwgrzybiczego, który w istotny sposób hamuje wzrost organizmu, co można wykryć na podstawie zmiany koloru.

Interpretacja wyników

TABELA 1. Ilustracja i interpretacja możliwych wyników oznaczeń

| Stężenie w dołku w µg/ml | | | | | | | C = czerwony: dodatni wskaźnik wzrostu N = niebieski: ujemny wskaźnik wzrostu |
|--------------------------|---|---|---|---|----|----|---|
| | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | |
| A. | C | C | C | N | N | N | Typowy wzór wzrostu; punkt końcowy MIC wynosi 8 µg/ml. |
| B. | C | C | C | C | C | C | Wzrost we wszystkich dołkach; punkt końcowy MIC wynosi > 32 µg/ml. |
| C. | N | N | N | N | N | N | Brak wzrostu w jakimkolwiek dołku; punkt końcowy MIC wynosi ≤ 1 µg/ml. |
| D. | C | C | C | N | C | C | Dołek do pominięcia. Punkt końcowy MIC wynosi > 32 µg/ml. Nie należy uwzględniać dołka do pominięcia, jeżeli z dowolnej jego strony występuje wzrost. Jeśli w kolumnie występuje więcej niż jedna kolumna, wyniki oznaczenia należy unieważnić ¹ . |
| E. | C | C | N | N | C | C | Podwójny dołek do pominięcia. Oznaczenie należy powtórzyć ¹ . |

¹ Jeśli stosuje się staranną technikę, takie przypadki nie są częste.

Uwagi dotyczące odczytywania wyniku

Amfoterycyna B

W przypadku odczytu amfoterycyny B po 24 godzinach punkty końcowe są zwykle łatwe do określenia, a MIC odczytuje jako najniższe stężenie leku, które zapobiega powstaniu jakichkolwiek zmian barwy. W przypadku amfoterycyny B zwykle nie spotyka się punktów końcowych z płynnym przejściem koloru.

Pierwszy dołek wykazujący wyraźną zmianę koloru w porównaniu z dołkiem dodatniego wzrostu wyznacza MIC.



Flucytozyna i azolowe leki przeciwgrzybiczne

Candida albicans, *C. glabrata* i *C. tropicalis* w przypadku badania z zastosowaniem flucytozyny i azoli, takich jak flukonazol, itraconazol, ketokonazol, worykonazol i pozakonazol, dają zazwyczaj mniej ostre punkty końcowe z powodu wzrostu z płynnym przejściem koloru, co może stanowić istotne źródło zmienności. Płynne przejście koloru występuje, gdy pomiędzy kolejnymi dołkami utrzymują się niewielkie różnice zabarwienia i zjawisko to często ma identyczną postać dla wszystkich stężeń leku powyżej MIC. MIC należy odczytywać jako pierwszy dołek wykazujący wyraźną zmianę koloru w porównaniu z dołkiem dodatniej kontroli wzrostu. Szczepy referencyjne o określonej wrażliwości mogą być także przydatne w szkoleniu personelu. Uznaje się, że izolaty *Candida krusei* są naturalnie odporne na flukonazol, nie należy więc w ich przypadku interpretować wartości MIC (1). Odnotowanemu wynikowi znaczenia powinien towarzyszyć komentarz.

Punkt końcowy z płynnym przejściem koloru: Zjawisko to następuje, gdy pomiędzy kolejnymi dołkami utrzymują się niewielkie różnice zabarwienia i często ma ono identyczną postać przy kilku różnych stężeniach leku. MIC należy odczytywać jako pierwszy dołek wykazujący wyraźną zmianę koloru w porównaniu z dołkiem dodatniej kontroli wzrostu.



Echinokandyny

Punkty końcowe MIC należy ustalać po 24-godzinnej inkubacji w 35°C. MIC należy odczytywać jako pierwszy dołek wykazujący wyraźną zmianę koloru w porównaniu z dołkiem kontroli dodatniej.



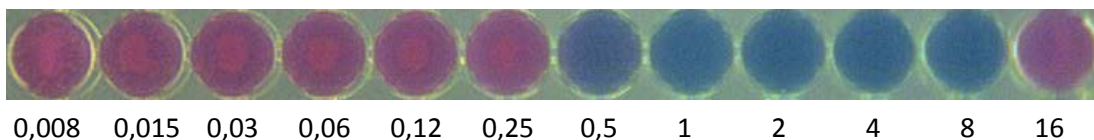
Itrakonazol

Itrakonazol może w sporadycznych wypadkach wytrącić się z roztworu przy stężeniach $\geq 4 \mu\text{g/ml}$. W dołku, w którym do tego dojdzie, może nastąpić wzrost i zmiana barwy na czerwoną.



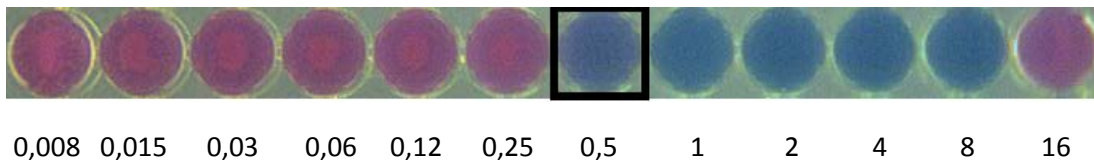
Od czasu do czasu spotykamy się z paradoksalnymi przypadkami wzrostu w wyższych stężeniach itrakonazolu w panelach Sensititre YeastOne, które skutkują zabarwieniem tych dołków na różowo.

Ten paradoksalny efekt, nazywany również zjawiskiem Eagle'a, odnosi się do sytuacji, w której zwiększanie stężenia środka przeciwdrobnoustrojowego powyżej określonej wartości paradoksalnie prowadzi do wzrostu liczby przeżywających bakterii. Możliwym wyjaśnieniem jest to, że przy zbyt wysokim stężeniu lek może działać niekorzystnie na receptor, z którym się wiąże (np. białka wiążące penicylinę w przypadku penicyliny).



Rozwiązanie

Wzrost przy wysokim stężeniu należy zignorować, chyba że występuje wzrost we wszystkich innych stężeniach itrakonazolu. W poniższym przykładzie oznaczony czarną ramką dołek o stężeniu $0,5 \mu\text{g/ml}$ wskazuje miejsce, w którym należy odczytać wynik MIC.



W przypadku jakichkolwiek innych pytań lub wątpliwości prosimy o kontakt z działem pomocy technicznej telefonicznie pod numerem: +44 (0) 1256 694287, za pomocą faksu pod numerem: +44 (0) 1256 463388 lub zapoznanie się ze stroną 12, na której zawarto listę wszystkich adresów e-mail.

Skażenie/dołki do pominięcia

Dołek zabarwiony na różowo (wzrost) pomiędzy dołkami zabarwionymi na niebiesko (brak wzrostu) może także wskazywać na skażenie. W celu ustalenia przyczyny należy wykonać hodowlę pochodną.

Niebieski dołek w serii dołków z czerwonym wzrostem wskazuje na dołek do pominięcia, który należy zignorować. Wartość MIC należy odczytywać powyżej ewentualnych płytek do pominięcia. Jeżeli występuje więcej niż jeden dołek do pominięcia, nie należy odnotowywać wyniku działania przeciwwgrzybiczego.

Kontrola jakości

Częstość badań kontroli jakości należy dostosować do lokalnych wytycznych¹.

Należy posiać inokulum na odpowiednim podłożu, aby sprawdzić jego czystość. Wyniki oznaczeń są nieważne, jeśli zostanie wykryta kultura mieszana.

Wszystkie płytki Sensititre Plates mają dołki dodatkowej kontroli wzrostu. Oznaczenia są nieważne, jeśli nie ma wyraźnego wzrostu we wszystkich dołkach dodatkowej kontroli wzrostu.

Do kontroli jakości zalecane są następujące hodowle ze zbioru American Type Culture Collection (ATCCTM):

Issatchenkia orientalis (Candida krusei) ATCC 6258

Candida parapsilosis ATCC 22019

Nie należy odnotowywać wyników, jeśli wyniki KJ nie mieszczą się w zakresie.

Spodziewane wartości KJ podano w normie CLSI M27; w przypadku gatunków z rodzaju *Aspergillus* należy się odnieść do dokumentu wytycznych M38.

Inokulacja, odczyt i interpretacja płytek Sensititre YeastOne do pomiaru lekowrażliwości w ramach kontroli jakości prowadzonej przez użytkownika powinny odbywać się tak, jak opisano to w poprzedniej sekcji.

Tabela 2. Zalecane limity MIC po 24 i 48 godzinach dla dwóch szczepów do kontroli jakości zgodnie z wytycznymi CLSI M27 testowania metodą mikrorozcieńczeń w bulionie (pozycja 2). Zakresy różniące się lub dodatkowe względem opublikowanych zakresów kontroli jakości są podkreślone.

| Środek przeciwwgrzybiczy | <i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC 6258 | | <i>Candida parapsilopsis</i> ATCC 22019 | |
|--------------------------|---|-----------|--|-----------|
| | 24 godziny | 48 godzin | 24 godziny | 48 godzin |
| 5-fluorocytozyna | 4–16 | 8–32 | <u>0,12–0,5</u> | 0,12–0,5 |
| Amfoterycyna B | 0,5–2 | 1–4 | 0,25–2 | 0,5–4 |
| Anidulafungina | 0,03–0,12 | - | 0,25–2 | - |
| Kaspofungina | 0,12–1 | 0,25–1 | 0,25–1 | 0,5–4 |
| Flukonazol | 8–64 | 16–128 | 0,5–4 | 2–8 |
| Itrakonazol | 0,12–1 | 0,25–1 | 0,06–0,5 | 0,12–0,5 |
| Mikafungina | 0,06–0,5* | 0,12–0,5 | 0,5–2 | 0,5–4 |
| Posakonazol | 0,06–0,5 | 0,12–1 | 0,03–0,25 | 0,06–0,25 |
| Worykonazol | 0,06–0,5 | 0,12–1 | 0,015–0,12 | 0,03–0,25 |

* Sensititre Zakres

Uznaje się, że izolaty *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*) są naturalnie odporne na flukonazol, nie należy więc w ich przypadku interpretować wartości MIC za pomocą tej skali.

UWAGA 1: Jeśli minimalne stężenia hamujące (MIC) dla *Candida* spp. są mierzone za pomocą skali, która daje wyniki plasujące się pomiędzy kategoriami, zakłada się, że wynik należy do następnej wyższej kategorii. Zatem izolatowi o MIC flukonazolu równym 12,5 ug/ml przypisano by kategorię S-DD.

Więcej informacji na temat interpretacji wyników można znaleźć w wytycznych CLSI¹.

Ograniczenia

1. Płytki Sensititre YeastOne Plates są przeznaczone do stosowania z niewymagającymi odżywczo drożdżami, w tym gatunkami z rodzaju *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* oraz różnymi szybko rosnącymi gatunkami drożdży. Nie są one przeznaczone do stosowania z wymagającymi odżywczo drożdżami, takimi jak rodzaje *Histoplasma* lub *Blastomyces*, ani z grzybami strzępkowymi.
2. Dokonano porównania między systemem Sensititre YeastOne po 24 godzinach a metodą referencyjną CLSI po 48 godzinach. Jednakże ze względu na trudności w korelacji punktów końcowych w przypadku organizmów dających płynne przejście koloru (*C. albicans*) po 48 godzinach inkubacji obserwuje się wysoki odsetek błędów.
3. Oznaczanie grzybów i leków przeciwwgrzybiczych jest z natury mniej precyzyjne niż badanie bakterii.
4. Niektórzy badacze sądzą, że odczyt po 24 godzinach jest bardziej odpowiedni niż odczyt po 48 godzinach ze względu na problem płynnego przejścia koloru w przypadku określonych izolatów. Według oficjalnej normy CLSI odczyty należy wykonywać po 48 godzinach. Do momentu zebrania i przeanalizowania wystarczającej ilości danych pytanie o najbardziej odpowiedni klinicznie czas odczytu pozostanie bez odpowiedzi. Odnotowane wyniki powinny zostać opatrzone wyraźnie określonym czasem odczytu.

5. Dodatkowe wytyczne można znaleźć w normie CLSI M27 dotyczącej wrażliwości drożdży na leki przeciwgrzybicze, a w przypadku rodzaju *Aspergillus* — w normie M38.
6. To zmiana koloru jest wskaźnikiem punktu końcowego, nie mętność. (Fakt ten pozwala ograniczyć pewne istotne wątpliwości dotyczące interpretacji niektórych gatunków z rodzaju *Candida* wynikające z płynnego przejścia koloru. Zjawisko płynnego przejścia zabarwienia jest częściej spotykane w przypadku izolatów innych niż pobrane z krwi i pozostałych jałowych płynów ustrojowych).
7. Nie należy dokonywać odczytu po 24 godzinach, jeśli dołek kontroli nie osiągnął pełnego wyniku dodatniego.
8. Nie ustalono wydajności w przypadku oznaczania worykonazolu z gatunkami z rodzaju *Cryptococcus* oraz szybko rosnącymi gatunkami drożdży. Wartości MIC worykonazolu należy więc podawać wyłącznie w przypadku gatunków z rodzaju *Candida*.
9. Należy stosować wyłącznie z bulionem do inokulacji przeznaczonym do oznaczania wrażliwości drożdży i zatwierdzonym do stosowania z systemem Sensititre. Stosowanie innych bulionów może poskutkować błędem.
10. Jak w przypadku wszystkich metod oznaczania wrażliwości w warunkach in vitro należy skorelować wyniki oznaczeń z odpowiedzią pacjenta na przepisany lek.
11. Wydajność ustalono wyłącznie w przypadku stosowania amfoterycyny B, itraconazolu, pozakonazolu oraz worykonazolu z gatunkami z rodzaju *Aspergillus*.
12. W odnośniku nr 5 wykazano wysoki poziom zgodności (> 99%) z metodą CLSI w przypadku amfoterycyny B i gatunków z rodzaju *Aspergillus*. Niższą zgodność zaobserwowano w przypadku itraconazolu: dla *A. fumigatus*, *A. flavus* oraz *A. terreus* wykazano zgodność > 90%, natomiast dla *A. nidulans* stwierdzono zgodność 85%, a dla *A. ustus* — 33% na panelach inkubowanych przez 48 godzin z inokulum 10^3 CFU/ml. Zgodność powyżej 90% obserwowano w przypadku inokulum 10^4 CFU/ml i 72-godzinnego czasu inkubacji z itraconazolem i amfoterycyną B (M38).
13. Korelacja między MIC kaspofunginy a wynikiem leczenia po zastosowaniu tego leku nie została jeszcze w pełni określona (9).
14. Nie ustalono wydajności systemu Sensititre YeastOne w przypadku oznaczania anidulafunginy, kaspofunginy i mykafunginy z gatunkami z rodzajów *Cryptococcus* i *Aspergillus* oraz szybko rosnącymi gatunkami drożdży **nienależącymi do rodzaju *Candida***. Wartości MIC anidulafunginy, kaspofunginy i mykafunginy należy więc podawać wyłącznie w przypadku gatunków z rodzaju *Candida*.
15. Nie ustalono wydajności płytki Sensititre YeastOne w przypadku oznaczania pozakonazolu z gatunkami z rodzaju *Cryptococcus*.
16. Do uzyskiwania wyników z wykorzystaniem produktów Sensititre z certyfikatem CE IVD i FDA wolno używać tylko narzędzi wspieranych przez system Sensititre, tj. prostego przyrządu do odczytu wykorzystującego lusterko lub systemu Sensititre Vizion. Nie jest wspierane stosowanie jakichkolwiek innych systemów.

Przeprowadzenie oznaczenia

Odczytywane ręcznie panele zaprojektowano tak, by charakteryzowały się podobną wydajnością do referencyjnej procedury mikrorozcieńczeń w bulionie według CLSI. Porównywalną wydajność definiuje się jako zasadniczą i kategoriową zgodność > 90% w zakresie podwojonego rozcieńczenia względem referencyjnej wartości MIC (1).

Piśmiennictwo

- (1) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087 (M27).
- (2) Espinel-Ingroff, A., Pfaller, M., Messer, S.A., Knapp, C.C., Killian, S., Norris, H.A., Ghannoun M.A. (1999). Multicentre comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric Antifungal Plate with the NCCLS, M27-A Reference Method for Testing Clinical Isolates of Common and Emerging *Candida* spp., and other Yeasts and Yeast-like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**: 591-595.
- (3) Espinel-Ingroff, A., Knapp, C.C., Holliday, N., Killian, S. (2002). Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel for testing voriconazole against Isolates of *Candida* spp., a comparison with the NCCLS M27-A microdilution reference method. *Clinical Microbiology and Infection*. **8**: Suppl 1. Abstract 0125.
- (4) Davey, K.G., Szekely, A., Johnson, E.M., Warnock, D.W., (1998). Comparison of a new commercial colorimetric microdilution method with a standard method for in-vitro susceptibility testing of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **42**: 439-444.
- (5) Meletiadis, J., Moutin, J.W., Meis, F.G.M., Bouman, B.A., Verweij, P.E., and EuroFung Network. (2002). Comparison of the E Test and the Sensititre® Colorimetric Methods with the NCCLS, Proposed Standard for Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**: 2876-2885.
- (6) Espinel-Ingroff, A., *etal.* (1997). Multicenter Evaluation of Proposed Standardized Procedure for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**: 139-143.
- (7) Pemán, J., *etal.* (2001). Comparison of the Sensititre YeastOne® Colorimetric method against reference M38-P for testing susceptibility of *Aspergillus* to Amphotericin B and Itraconazole. *Clinical Microbiology and Infection*, **7**: Suppl. 1. Abstract P694.
- (8) Linares, M., J., G. Charriel, F. Solís, F. Rodriguez, A. Ibarra and M. Casal. (2005) Susceptibility of filamentous fungi to voriconazole tested by two microdilution methods. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: 250-253
- (9) Kartsonis, N., *etal.* (2005). Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 3616-3623
- (10) Pfaller, M., A., *etal.* (2004) Clinical evaluation of a dried commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of five antifungal agents against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **50** :113-117

- (11) Pfaller, M, A., A. Espinel-Ingroff and R.N. Jones. (2004) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne® antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posiconazole and ravuconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 4577-4580
- (12) Espinel-Ingroff, A., *etal.* (2004) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel with the NCCLS, M27-A2 reference method for testing new antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 718- 721
- (13) Linares, M, J., G. Charriel, F. Solís and M. Casal. (2004). Comparison of two microdilution methods for testing susceptibility of *Candida* spp. to voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 899-902
- (14) Espinel-Ingroff, A., M. Pfaller, S.A. Messer, C.C. Knapp, S. Killian, H.A. Norris, and M.A. Ghannoum. (1999) Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other Yeasts and Yeast-Like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 591-595
- (15) Barry, A.L., M.A. Pfaller, S.D. Brown, A. Espinel-Ingroff, M.A. Ghannoum, C.c. Knapp, R.P. Rennie, J.H. Rex, and M.G. Rinaldi. (2000) Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 3457-3459
- (16) Canton, E., *etal* (2005) .Sensititre YeastOne® Caspofungin susceptibility testing of *Candida* clinical isolates: Correlation with results of NCCLS, M27-A2 multicenter study . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 1604 -1607
- (17) Holliday, N.M., *etal* (2007) A reproducibility study with two echinocandins using the Sensititre YeastOne® susceptibility plate. *American Microbiology Abstract* **C-191**
- (18) Torres-Nabona, M., J. Guinea, J.Martinez_Alarcon, T. Pelaez, and E. Bouza. (2007) *In Vitro* activities of amphotericin B, caspofungin, itraconazole, posaconazole, and voriconazole against 45 clinical isolates of Zygomycetes: Comparison of NCCLS, M38-A , Sensititre YeastOne® and the Etest. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 1126 -1129
- (19) Espinel-Ingroff, A. (2006) Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assays for testing Zygomycetes, *Aspergillus* spp, *Candida* spp, and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and Amphotericin B. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 3616-3622
- (20) Patel, R., C. Mendrick, C.C. Knapp, R. Grist, and P.M. McNicholas. (2007) Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne® plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posaconazole. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2000-2001
- (21) Alexander, B. D., T.C. Byrne, K.L. Smith, K.E. Hansen, K.J. Anstrom, J.R. Perfect and L. B. Reller. (2007) Comparative evaluation of Etest and Sensititre YeastOne® panels against the Clinical Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 698-706
-

(22). Patel, R., *etal.* (2007). Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne plate for testing susceptibility of filamentous fungi to posiconazole. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**: 2000-2001


WYŁĄCZENIE ODPOWIEDZIALNOŚCI

Informacje zawarte w niniejszej ulotce technicznej są aktualne w momencie jej wydrukowania i mogą ulec zmianie bez powiadomienia.

Najnowsze informacje można pobrać ze strony www.trekds.com\techinfo lub uzyskać, kontaktując się z Pomocą Techniczną Działu Mikrobiologicznego firmy Thermo Fisher Scientific.



Producent: TREK Diagnostic Systems (część firmy Thermo Fisher Scientific Inc)
Units 17–19 Birches Industrial Estate, East Grinstead,
West Sussex. RH19 1XZ, Wielka Brytania.
Tel.: +44- 1342-318777

 Emblemat ATCC Licensed Derivative®, znak słowny ATCC Licensed Derivative® oraz znaki katalogowe ATCC są znakami handlowymi firmy ATCC. Firma Thermo Fisher Scientific Inc. posiada zezwolenie na wykorzystywanie tych znaków handlowych i sprzedaż produktów pozyskiwanych z kultur ATCC®.




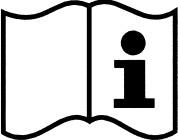
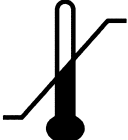


© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone. ATCC jest znakiem towarowym ATCC. Wszelkie pozostałe znaki handlowe stanowią własność firmy Thermo Fisher Scientific Inc. i jej spółek zależnych.

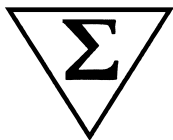


Adresy e-mail pomocy technicznej

| | |
|---|---|
| Austria | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Belgia | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| Czechy | mikrobiologie.tech.podpora.cz@thermofisher.com |
| Dania | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Francja | microbiologie.techsupport.fr@thermofisher.com |
| Finlandia | mikrobiologia.tekninentuki.fi@thermofisher.com |
| Niemcy | microbiology.techsupport.de@thermofisher.com |
| Włochy | microbiologia.supportotecnico.it@thermofisher.com |
| Holandia | microbiology.techsupport.benelux@thermofisher.com |
| Norwegia | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Hiszpania | microbiologia.soporte.es@thermofisher.com |
| Szwecja | microbiology.techsupport.nordic@thermofisher.com |
| Pomoc techniczna — Wielka Brytania | microbiology.techsupport.uk@thermofisher.com |

Symbols/Símbolos/Simboli/Symbol/Symboles/σύμβολο/Simbolis/Symbole

| | | |
|---|--|--|
|  | GB DE ES IT FR GR LI CZ PL RO PT | Batch code Chargenbezeichnung Código de lote Codice del lotto Code du lot Κωδικός παρτίδας serijos numerį. šarže kadex Kod Partii lot număr Código do grupo |
|  | GB DE ES IT FR GR LI CZ PL RO PT | Catalogue number Bestellnummer Número de catálogo Numero di catalogo Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Reikia žinoti plokštelės kodą Katalogovho číslovka Numer Katalogu Catalog număr Número de catálogo |
|  | GB DE ES IT FR GR LI CZ PL RO PT | Manufacturer Hersteller Fabricante Fabbricante Fabricant Κατασκευαστής Dirbti Výrobce Producent Manufacturer Fabricante |
|  | GB DE ES IT FR GR LI CZ PL RO PT | Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Ieškant instrukcija Projednat Instrukce Zauziti Przed użyciem zapoznaj się z instrukcją Consulate instrucțiuni pentru folos Consulte instruções para o uso |
|  | GB DE ES IT FR GR LI CZ PL RO PT | Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Límite de temperatura Limiti di temperatura Limites de température Όριο θερμοκρασίας Temperatura reba Templota Limit Ograniczenie Temperatur Temperatură limitation Limitação de temperatura |
|  | GB DE ES IT FR GR LI CZ PL RO PT | Use By Verwendbar bis Fecha de caducidad Utilizzare entro Date de péremption Ημερομηνία λήξης Baigtis Data Užiti Za Użyć Do Folos By Uso perto YYYYMMDD/YYYYMM (MM=end of month) JJJJMMTT/JJJJmm (MM=Monatsende) aaaammdd/aaaamm (mm=fin del mes) AAAAMMGG/AAAAMM (MM=fine mese) AAAAMMJJ/AAAAMM (MM=fin de mois) EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) KKKKMMDD RRRRMMDD RRRR/MM/DD AAAA/LL/ZZ YYYYMMDD/YYYYMM (MM= fim do mês) |
|  | GB DE ES IT FR GR LI CZ PL RO PT | In Vitro Diagnostic Medical Device In Vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositif médical de diagnostic in vitro In vitro διαγνωστικό ιατρικό βοήθημα In vitro diagnostikai In vitro diagnostic Urządzenie Diagnostyczne in vitro Pentru diagnosticare in vitro In Vitro Dispositivo Médico Diagnóstico |



| | |
|----|--|
| GB | Contains sufficient for <n> tests |
| DE | Ausreichend für <n> Ansätze |
| ES | Contenido suficiente para <n> ensayos |
| IT | Contenuto sufficiente per <n> saggi |
| FR | Contenu suffisant pour <n> tests |
| GR | Περιέχει επαρκή ποσότητα για <n> εξετάσεις |
| LI | Skaičius bandymas <n> |
| CZ | Obsahuje vhodný <n> testy |
| PL | Wystarczający dla <n> próbek |
| RO | contact sufficient pentru <n> tests |
| PT | Contem suficiente para <n> testes |

SYMBOLS_V2.1