



**ФБУН НИИ
эпидемиологии и микробиологии
имени ПАСТЕРА
Отдел Новых Технологий
«МИКОТЕСТ – АЧ»**

Утверждено
Ученым Советом
НИИЭМ имени
Пастера
26 сентября 2018 г

инструкция по применению
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОСНОВНЫХ
ПАТОГЕННЫХ ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ
ГРИБОВ (*Candida spp.* и др.) К
АНТИМИКОТИКАМ

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор «МИКОТЕСТ – АЧ» предназначен для определения чувствительности основных патогенных дрожжеподобных грибов (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *Cryptococcus neoformans*, *Sacharomyces cerevisiae* и др.) к 7 антимикотикам (амфотерицин В, клотримазол, миконазол, кетоконазол, итраконазол, флуконазол, вориконазол), которые представлены в концентрациях, позволяющих оценить исследуемые штаммы как чувствительные, с промежуточной резистентностью, или резистентные.

Набор «МИКОТЕСТ – АЧ» рассчитан на проведение 12 анализов, включая контроли.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Модифицированная питательная среда Сабуро обеспечивает оптимальные условия для роста основных патогенных дрожжеподобных грибов. Система индикаторов (Azur du Pérou®), входящая в состав среды, позволяет визуально интерпретировать результаты, по изменению цвета среды.

В лунках стрипов сорбированы антимикотики. После внесения в лунки инокулята сорбированные антимикотики растворяются. В тех лунках, где антимикотики подавляют рост дрожжеподобных грибов, изменения исходного цвета среды не происходит. В тех лунках, где антимикотики не подавляют рост дрожжеподобных грибов, происходит изменение цвета среды с лилового на желтый.

СОСТАВ НАБОРА

16-луночные стрипы с сорбированными антимикотиками	12 шт.
Модифицированная питательная среда Сабуро, лиофилизированная	1 фл.
Масло вазелиновое, 20 мл	1 фл.
Виалы для приготовления стандартизованного инокулята	12 шт.
Виала «стандарт мутности 0,5 McF»	1 шт.
Пробирки Эппендорфа для посевного инокулята (V=2,0 мл)	12 шт.
Бланк учёта результатов	12 шт.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

Набор «МИКОТЕСТ – АЧ» предназначен только для *in vitro* диагностики.

Входящие в компоненты набора вещества инактивированы и безопасны. Однако исследуемые клинические материалы, а также сточные растворы, оборудование и материалы, находящиеся с ними в контакте, представляют собой потенциально инфекционный материал, и обращаться с ними следует, соблюдая технику безопасности.

Следует избегать любого контакта компонентов набора со слизистыми оболочками.

При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ:

- Термостат, поддерживающий температуру $37\pm 1^{\circ}\text{C}$; $32\pm 1^{\circ}\text{C}$
- денситометр (МакФарланд), необязательно;
- дозаторы пипеточные;
- горелка газовая (спиртовка);
- вода дистиллированная;
- плотная питательная среда Сабуро;
- физиологический раствор.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Необходимым условием для проведения данного теста является наличие положительных культур дрожжеподобных грибов в клини-

ческом материале.

1. Приготовление пробирок с жидкой питательной средой

Во флакон с лиофилизированной питательной средой Сабуро (модифицированной) внести 25 мл дистиллированной воды. Содержимое флакона перемешать до растворения (допускается небольшой осадок тёмного цвета). Полученный раствор лилового цвета при постоянном перемешивании разлить по 1,98 мл в пробирки Эппендорфа объёмом 2 мл для приготовления посевого инокулята и хранить при температуре 2-8 °С не более 7 суток или при температуре минус 7 °С и ниже не более 2 мес.

Перед проведением анализа пробирки со средой выдержать при комнатной температуре (18-25 °С) в течение 1 ч. Раствор в пробирках должен быть прозрачным, лилового цвета (допускается небольшой осадок тёмного цвета).

В случае помутнения раствора или изменения его цвета пробирки со средой в работе не использовать!

2. Приготовление инокулятов (см. рис. 1)

Наиболее подходящим материалом для приготовления инокулятов является молодая культура, свежевыделенная из клинического материала (24 – 48 часов), желательно при $t = 37 \pm 1^\circ\text{C}$ на плотной питательной среде Сабуро.

2.1 Приготовление стандартизованного инокулята¹

В виалу для приготовления стандартизованного инокулята (виала с белой крышкой) внести 2 мл стерильного физиологического раствора (0,9 % NaCl), после чего ресуспендировать в нем 1-2 идентичные колонии, снятые с полученной суточной культуры. Встряхнуть. Стандартизация полученной суспензии до 0,5 по стандарту МакФарланда может быть выполнена тремя различными способами:

- **С помощью стандарта мутности:** Довести мутность исследуемого образца до контроля мутности (виала «0,5 McF»), ориентируясь на **контрастные черные полосы**, напечатанные на этикетках виал.

1.- Допустимо приготовление стандартизованного инокулята (при условии наличия достоверной положительной пробы) из молодой жидкой культуры образца (не более 24 – 48 часов культивирования): В виалу для приготовления стандартизованного инокулята (виала с белой крышкой) внести 2 мл стерильного физиологического раствора (0,9% NaCl), после чего внести в нее 50-80 мкл суспензии из жидкой культуры. Встряхнуть. Далее, стандартизацию полученной суспензии можно выполнить как описано ниже.

Сравнение осуществлять одновременным просмотром двух виал, добиваясь одинаковой мутности.

Если образец светлее (недостаточно инокулята), виала должна быть инокулирована повторно до тех пор, пока наблюдаемая мутность не совпадет с контролем мутности.

Если образец мутнее (изобилие инокулята), развести его физиологическим раствором до получения необходимой мутности.

Одинаковое искажение или перекрывание черных полос свидетельствует об идентичности мутностей.

- **С помощью денситометра:** Довести плотность суспензии до 0,5 по стандарту МакФарланда. При необходимости продолжить, как описано выше.
- **С помощью камеры Горяева:** Возможно определение исходного титра суспензии в камере Горяева, предназначенной для подсчета количества клеток в заданном объеме жидкости. Конечный титр суспензии должен соответствовать концентрации 1×10^6 КОЕ/мл.

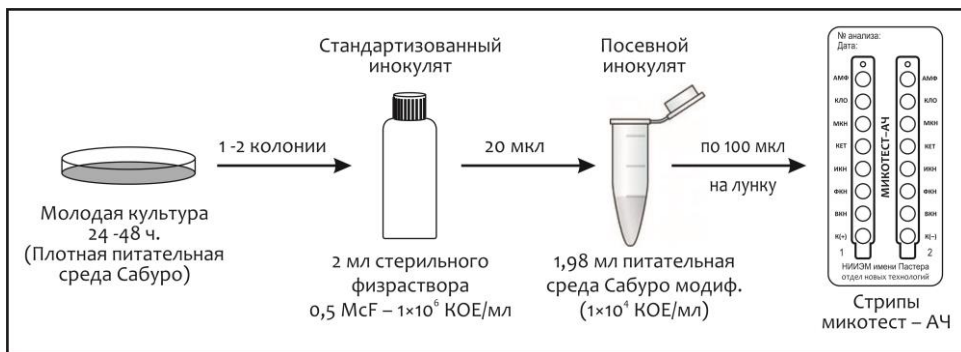
Таким образом, доведенная любым способом плотность суспензии клеток до 0,5 по стандарту МакФарланда соответствует концентрации – 1×10^6 КОЕ/мл.

2.2 Приготовление посевного инокулята

Посевной инокулят является разведением 1:100 стандартизованного ранее инокулята в питательной среде. Для чего 20 мкл стандартизованного инокулята добавить в пробирку для приготовления посевного инокулята, содержащую 1,98 мл питательной среды.

Приготовленный посевной инокулят содержит 1×10^4 КОЕ/мл.

Рис. 1. Схема приготовления инокулятов.



3. Проведение теста (инокуляция и инкубация).

Ниже описана процедура для одного стрипа (см. рис. 2).

В лунку с отрицательным контролем К (-) внести 100 мкл питательной среды. Во все остальные лунки стрипа внести по 100 мкл приготовленного посевного инокулята, который перед внесением перемешать встряхиванием.

Во все лунки стрипа добавить по 2-3 капли (50 – 75 мкл) вазелинового масла и стрип поместить в термостат при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ на 14 – 48 ч, в зависимости от вида возбудителя.

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учитывать результаты при изменении цвета в лунке с положительным контролем с лилового на желтый. Учет результатов проводить через 14 - 24 часа, если в лунке с положительным контролем цвет еще не изменился увеличить время инкубации. Окончательный учет результатов через 48 часов.

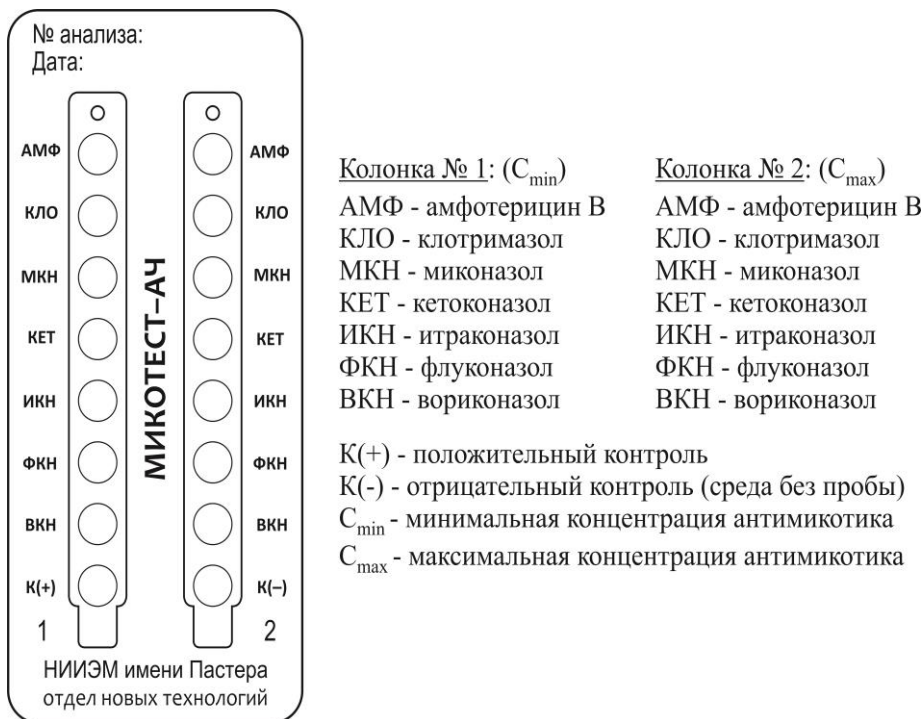
Изменения цвета среды в лунках стрипа оцениваются визуально: при изменении цвета, образец оценивается как положительный «+»; при отсутствии изменения цвета, образец оценивается как отрицательный «-».

Определение чувствительности

При изменении цвета среды «+» в лунках с наибольшей и с наименьшей концентрациями антимикотика штамм расценивается как резистентный (R). При изменении цвета среды «+» только в лунке с наименьшей концентрацией антимикотика – как с промежуточной

резистентностью (I). При отсутствии изменения цвета «←→» - как чувствительный (S).

Рис. 2. Схема расположения антибиотиков и контролей в лунках стрипов.



УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор «МИКОТЕСТ – АЧ» следует хранить при температуре 2-8 °С в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 2 недель.

Срок годности набора – 24 мес.

Приготовленную питательную среду можно хранить при температуре 2-8 °С не более 1 недели или при температуре минус 7 °С и ниже не более 2 мес.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора «МИКОТЕСТ – АЧ», следует обращаться в ФБУН НИИЭМ имени Пастера по адресу: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, тел./факс: (812) 233-17-03, 346-83-87, телефон (812) 325-27-10, 346-83-86

<http://www.dntpasteur.ru>; e-mail: pasteurdnt@ya.ru



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14, ОНТ
(812) 313-69-89, 233-17-03, 313-69-88, 325-27-10

dntpasteur@yandex.ru
www.dntpasteur.ru