

## Тестирование противогрибковой чувствительности

### НАЗНАЧЕНИЕ

Etest является основанным на агаре градиентным методом количественного тестирования противогрибковой чувствительности (AFST). Система состоит из градиента специфического противогрибкового препарата заданной концентрации, который используется для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК), выраженной в  $\mu\text{г/мл}$ , при которой рост определенного микроорганизма будет подавлен при заданных экспериментальных условиях.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ТОЛКОВАНИЕ

Современные методы тестирования противогрибковой чувствительности основываются или на количественном методе серийных разведений, или на качественном методе диффузии. В основе метода разведения лежит принцип двукратных серийных разведений противогрибковых препаратов в бульоне. Эти методы определяют значение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) отдельно взятого противогрибкового препарата в  $\mu\text{г/мл}$ , при которой рост определенного грибка будет подавлен при заданных экспериментальных условиях.

### ПРИНЦИПЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Методика градиента Etest комбинирует метод разведений и принципы диффузии при определении чувствительности. Как и другие методы разведений, Etest непосредственно выражает противогрибковую чувствительность количественно в виде отдельных значений МИК. Однако, используя стандартный, стабильный и постоянный градиент концентрации противогрибкового препарата, с помощью Etest можно получить более точные и воспроизводимые значения МИК, чем результаты, полученные при традиционном методе, основанном на прерывистом двукратном серийном разведении.

Градиент концентрации как таковой представляет собой формат, который признается полезным для определения различных механизмов резистентности. Исследования продемонстрировали, например, что Etest может эффективно выявлять гетерорезистентность и природную устойчивость *Candida krusei* и *C. glabrata* к азолам.

Хотя Etest обрабатывается подобно дисковому диффузионному тесту, стабильный и постоянный градиент концентрации противогрибкового препарата позволяет четко различить эти методы. В отличие от теста дисковой диффузии, на результаты МИК Etest не влияют аналогичным образом физико-химические свойства препарата, например, его молекулярный вес, растворимость и коэффициент диффузии, а также не одинаковые характеристики роста разных микроорганизмов.

Etest представляет собой тонкую, инертную, не пористую пластиковую тест-полоску. На одну сторону тест-полоски (А) нанесена шкала МИК в  $\mu\text{г/мл}$  и двух- или трехбуквенный код сверху для обозначения наименования противогрибкового препарата. На другой стороне тест-полоски (В) зафиксирован стандартный экспоненциальный градиент противогрибкового препарата в сухом и стабилизированном виде с максимальной концентрацией в точке **а** и минимальной в точке **б** (рис. 1). Градиент покрывает непрерывный диапазон концентрации в пределах 15 двукратных разведений традиционного метода МИК.

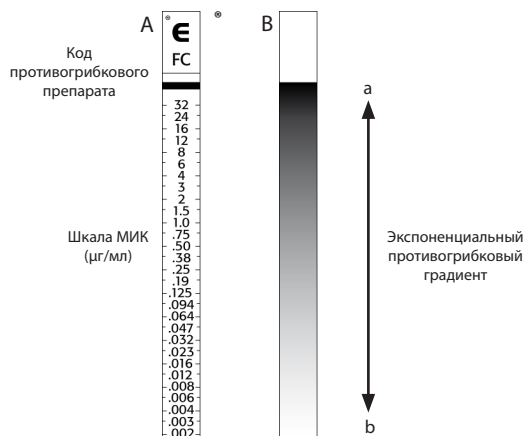


Рис. 1. Конфигурация градиента Etest

Когда тест-полоска с градиентом Etest накладывается на поверхность засеянного агара, подготовленный градиент противогрибкового препарата сразу и эффективно попадает с несущей пластиковой поверхности в агаровую матрицу. Стабильный, постоянный экспоненциальный градиент

концентраций противогрибкового препарата формируется непосредственно под тест-полоской. После инкубации, в результате которой бактериальный рост становится видимым, вдоль тест-полоски можно увидеть симметричный эллипс ингибирования. В месте пересечения заостренного конца эллипса с тест-полоской считываются значения МИК в  $\mu\text{г/мл}$ .

Для получения воспроизводимых результатов МИК при использовании метода градиента очень важно поддерживать стабильность градиента в течение всего критического периода, когда определяется граница роста/ингибирования для определенной комбинации грибка и противогрибкового препарата. Благодаря стабильности и точности стандартного градиента Etest, было доказано, что значения МИК являются воспроизводимыми и соответствуют значениям, полученным при референсном методе разведений CLSI®.

### РЕАКТИВЫ

Etest поставляется в упаковке по 30 или 100 тест-полосок одного противогрибкового препарата (в зависимости от формата упаковки).

### ХРАНЕНИЕ

Тест-полоски Etest всегда должны храниться при температуре, указанной на упаковке, до истечения срока годности. Тест-полоски всегда можно хранить при температуре меньшей, чем максимальная указанная.

Тест-полоски с градиентом Etest, оставшиеся неизрасходованными из открытой упаковки, следует хранить в сухом месте. Открытую упаковку следует плотно закрыть герметизирующим зажимом или поместить в воздухонепроницаемый контейнер с активным влагопоглотителем и хранить в пределах температур, указанных на этикетке. При правильном хранении и обращении неизрасходованные тест-полоски в контейнерах для хранения можно использовать до истечения срока годности. Следует убедиться, что на контейнере для хранения указаны номер серии и дата окончания срока годности. Тест-полоски Etest необходимо всегда хранить в сухом, прохладном, защищенном от воздействия яркого света месте.

**Необходимо следить за тем, чтобы влага не проникала в упаковку и контейнер для хранения и не конденсировалась в них. Тест-полоски Etest необходимо сохранять сухими с помощью активного влагопоглотителя.**

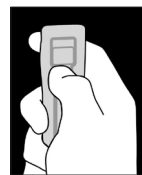
### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

- Перед использованием тест-полосок с градиентом Etest из нераскрытой упаковки необходимо осмотреть упаковку на предмет отсутствия повреждений. Не допускается использование тест-полосок Etest с градиентом из поврежденных упаковок.
- После изъятия из холодильника/морозильника необходимо выдержать заводскую упаковку или контейнер при комнатной температуре до вскрытия (около 15 минут при начальной температуре  $+4^\circ\text{C}$ , около 30 минут при начальной температуре  $-20^\circ\text{C}$ ). Перед вскрытием упаковки необходимо дождаться полного испарения влаги, которая могла сконденсироваться на внешней поверхности упаковки. Упаковки, хранимые при комнатной температуре, можно использовать сразу.

- Инструкции по вскрытию упаковки:

- Единичная упаковка (см. на рисунке внизу)

1. Держите упаковку между большим и указательным пальцами, поместив кончик большого пальца в углубление на задней стороне.
2. Нажмите большим пальцем вперед и указательным пальцем назад и отломите алюминиевую оболочку так, чтобы влагопоглотитель оставался сверху упаковки.
3. Согните верхнюю часть назад, чтобы полностью открыть упаковку.
4. Извлеките тест-полоску Etest из упаковки с помощью пинцета или другого ручного аппликатора.



- Блистерная упаковка
  - Откройте один блистерный отдел, ножницами разрезав упаковку вдоль пунктирной линии.
- Пенопластовая упаковка
  - Откройте упаковку, ножницами отрезав один конец алюминиевого пакета.

- При обращении с тест-полосками Etest вручную их можно брать только за верхнюю часть, т.е. область, где находится двух- или трехбуквенный код. **Нельзя прикасаться к поверхности полоски в зоне нанесения градиента противогрибкового препарата, т.е. со стороны, противоположной стороне с нанесенной шкалой МИК (рис. 1, В).** До начала использования тест-полоски можно поместить в лоток аппликатора (рис. 3). Успешно взять тест-полоску Etest можно с помощью ручного аппликатора (например, Mini Grip-It, пинцета или подобного устройства) или вакуумного пинцета Nema C88™ (bioMérieux) (рис. 3 и 4). Пенопластовые картриджи с полосками Etest должны напрямую загружаться в прибор для автоматического нанесения Simplex C76™ (bioMérieux).

#### МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Тест-полоски Etest предназначены только для диагностики *in vitro*.
- Хотя методика применения тест-полосок Etest проста, тестирование должно проводиться только обученным персоналом.
- При обращении с образцами грибковых культур необходимо использовать асептические методы и меры предосторожности, направленные на предотвращение угрозы при опасности микробиологического заражения.

#### ПРОЦЕДУРЫ

##### Предоставляемые материалы

- 30 или 100 тест-полосок Etest одного противогрибкового препарата.
- 1 листок-вкладыш + ТАБЛИЦА 1, поставляемые в комплекте или доступные для скачивания с веб-сайта [www.biomerieux.com/techlib](http://www.biomerieux.com/techlib)

##### Необходимые материалы, не предоставляемые в наборе

- Чашки с агаровой средой RPMI (глубиной  $4,0 \pm 0,5$  мм)
- Агар Сабуро с декстрозой (bioMérieux Ref. № 43 555) или картофельный агар с декстрозой
- Стерильный солевой раствор (0,85 % NaCl)
- Тампоны (стерильные, нетоксичные и не слишком плотно скрученные), стерильные петли, пробирки, вортекс-миксер и ножницы
- Ручной аппликатор [например, Mini Grip-It (bioMérieux Ref. № 411200), пинцет или подобное устройство] или bioTools [Retro C80™ (bioMérieux Ref. № 559803), Nema C88™ (bioMérieux Ref. № 559804), Simplex C76™ (bioMérieux Ref. № 559802)]
- Стандарт мутности 0,5 и 1 по шкале МакФарланда (bioMérieux Ref. № 70 900) или DENSIMAT (bioMérieux Ref. № 99 234)
- Инкубатор ( $35 \pm 2$  °C)
- Микроорганизмы для контроля качества (например, LyfoCults® Plus)
- Контейнеры для хранения с капсулами активного влагопоглотителя (bioMérieux Ref. № 501603, 559900, 559901 или 559902), или пакеты и/или герметизирующие зажимы (bioMérieux Ref. № 559809)

#### Питательная среда

Следует использовать бульон RPMI 1640 (с L-глутамином и красным фенолом без бикарбоната) + MOPS (0,165 моль/л) + 2 % глюкозы + 1,5 % бакто-агара (рН  $7,0 \pm 0,1$ ). При использовании питательной среды RPMI 1640 от разных коммерческих поставщиков необходимо обязательно осуществлять контроль качества (КК) с использованием стандартных референсных штаммов, чтобы убедиться, что полученные результаты МИК находятся в пределах спецификаций КК (см. **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**). Не используйте конкретную марку или серию питательной среды, если результаты выходят за пределы КК.

#### Приготовление суспензии

Гомогенизируйте несколько хорошо изолированных колоний из чистой культуры, выдержанной от 24 до 48 часов на агаре Сабуро с декстрозой, в солевом растворе до достижения мутности, эквивалентной стандарту 0,5 по шкале МакФарланда. В случае слизистых колоний микроорганизмов используйте стандарт 1 по шкале МакФарланда для компенсации мутности, связанной с капсульным материалом штамма. Дополнительная техническая информация предоставлена в Техническом руководстве Etest № 10 (ETG10), опубликованном на сайте [www.biomerieux.com/techlib](http://www.biomerieux.com/techlib).

#### Посев

Смочите стерильный, нетоксичный и не слишком плотно скрученный тампон в посевной суспензии и отожмите лишнюю жидкость, придавив его к внутренней стенке пробирки. Тщательно трижды заштрихуйте всю поверхность агара, каждый раз поворачивая чашку на 60 градусов, чтобы обеспечить равномерное распределение посевного материала. **Снова смочите тампон и повторите штриховку еще раз.** Либо используйте Retro C80 (устройство для автоматического засева, bioMérieux) для эффективного распределения посевной суспензии по поверхности агара, затем снова смочите тампон перед повторной штриховкой. Дайте избытку влаги адсорбироваться в течение 15–20 минут, так чтобы **поверхность была полностью сухой перед нанесением тест-полосок с градиентом Etest.**

#### Примечания:

1. В случае эхинокандинов может понадобиться предварительно высушить чашки RPMI в инкубаторе (около 15 минут).
2. При оптимальной суспензии и посеве должен быть получен равномерный сплошной рост колоний на поверхности среды.

3. Стандарты мутности по шкале МакФарланда не гарантируют правильного количества жизнеспособных бактерий в суспензии. Необходимо проводить регулярный подсчет колоний для проверки того, обеспечивает ли используемая методика посева получение нужного количества жизнеспособных бактерий (в КОЕ/мл). Смотрите раздел **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**.
4. Дополнительная техническая информация предоставлена в руководстве по применению Etest (EAG), а информация о питательной среде для тестирования противогрибковой чувствительности - в информационном листке пользователя Etest (CIS 005), опубликованных на сайте [www.biomerieux.com/techlib](http://www.biomerieux.com/techlib).

#### Нанесение тест-полосок

Проверьте, чтобы засеваемая поверхность агара была полностью сухой перед нанесением тест-полосок с градиентом Etest.

Откройте упаковку и обращайтесь с тест-полосками Etest в соответствии с указаниями, приведенными в разделе **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**.

Можно использовать шаблон для оптимального помещения тест-полосок Etest равноудаленно друг от друга в чашке с агаром. В одной 150 мм чашке с агаром можно разместить от четырех до шести (максимальное количество) тест-полосок Etest (рис. 2а). Для определения одной МИК одну или две тест-полоски можно использовать в одной 90 мм чашке с агаром (рис. 2б). При использовании аппарата Simplex C76 (рис. 6) размещение тест-полосок автоматически оптимизировано. Для микроорганизмов с ожидаемой высокой чувствительностью используйте меньше тест-полосок на 150 мм чашку с агаром и лишь одну на 90 мм чашку.

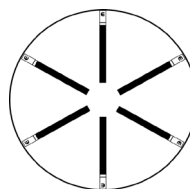


Рис. 2а.

Образец для 6 тест-полосок в 150-мм чашке

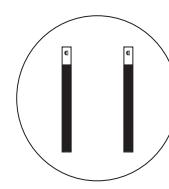


Рис. 2б.

Образец для 2 тест-полосок в 90-мм чашке

Для нанесения тест-полосок Etest на поверхность засеянной агаровой среды используйте пинцет, ручной аппликатор, Nema C88 (рис. 5) или Simplex C76 (рис. 6). Следует всегда помещать тест-полоску с градиентом Etest **шкалой МИК вверх** (шкалой в сторону крышки чашки) и максимальной концентрацией ближе к краю чашки (рис. 2а).



Рис. 3.

Поднятие тест-полоски Etest с лотка с помощью Mini Grip-It



Рис. 4.

Тест-полоски Etest можно загружать непосредственно из кассеты при помощи Nema C88

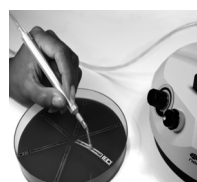


Рис. 5.

Нанесение тест-полоски Etest на поверхность агаровой среды с помощью Nema C88



Рис. 6.

Автоматический аппликатор Simplex C76

Необходимо убедиться, что тест-полоска полностью прилегает к поверхности агара. Не следует размещать тест-полоску в перевёрнутом положении, так как эллипс ингибирования не образуется, поскольку противогрибковый препарат не может проникнуть через непористый пластиковый носитель. При необходимости можно удалить воздушные полости, видимые под тест-полоской, осторожно нажимая на полоску (не двигая ее) кончиком аппликатора или пинцетом, при этом направление движения должно быть от минимальной концентрации к максимальной. Маленькие пузырьки не влияют на результаты тестирования. **После нанесения полоску нельзя сдвигать из-за мгновенного высвобождения противогрибкового препарата в агар.**

## Культивирование

Культивируйте перевернутые чашки с агаром во влажной окружающей среде в инкубаторе при  $35 \pm 2$  °C до явного проявления роста. Для поддержания влажности чашки с агаром можно завернуть в неплотно сложенный полиэтиловый пакет, прежде чем помещать их в инкубатор. Большинство видов *Candida* демонстрирует хороший рост в течение 24 часов, однако подтверждающие результаты следует снимать через 48 часов. Это позволит оценить медленно растущие виды *Candida* и обеспечить выявление замедленного проявления гетерорезистентности. Информация об условиях инкубации представлена в руководстве по применению Etest (EAG), опубликованном на сайте [www.biomerieux.com/techlib](http://www.biomerieux.com/techlib).

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

### Учет результатов МИК

После требуемого инкубационного периода и только при явно видимом бактериальном росте отметьте значения МИК в месте, где заостренный конец эллипса ингибирования пересекает тест-полоску. Не снимайте результаты, если культура выглядит смешанной или если бактериальный рост очень незначительный или слишком густой. Повторите тест.

Конечные показатели МИК в методе Etest обычно четко выражены, но возможно увидеть также различные картины роста-ингибирования и стелющиеся конечные показатели. Ознакомьтесь с приведенными ниже рекомендациями и иллюстрациями в **ИНСТРУКЦИИ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ETEST** (Рис. 7–24).

## ВАЖНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ ПО УЧЕТУ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Виды дрожжей, противогрибковый препарат, питательная среда, инкубационный период, суспензия и механизм резистентности могут влиять на конечные показатели МИК, особенно в случае азолов.
- Для флуцитозина снимайте стелющиеся конечные показатели приблизительно в месте 90 % ингибирования, не обращая внимания на легкие помутнения и микроколонию.
- Азолы могут давать диффузные конечные показатели, в большей степени это относится к некоторым видам *Candida*. Считывайте МИК в первой точке значительного ингибирования или заметного снижения плотности роста. Пользуйтесь принципом так называемого 80 % ингибирования для визуального определения конечного показателя МИК.
- Используйте *S. albicans* ATCC® 90028™ для считывания 80 % ингибирования при проявлении стелющегося роста в случае азолов.
- Снимайте конечные показатели амфотерицина В в месте 100 % ингибирования, т.е. после полной остановки роста, включая все микроколонию, зоны помутнения и изолированные колонии.
- Для эхинокандинов (например, каспофунгина) при наличии стелющихся конечных показателей снимайте показания в месте 80 % ингибирования, т.е. в первой точке значительного ингибирования, видимой невооруженным глазом.
- Плотность суспензии может влиять на четкость конечных показателей, особенно в случае азолов. Более легкая, но правильно приготовленная суспензия обычно дает более четкие результаты.
- На облик конечных показателей может влиять также метод посева. Равномерно нанесите штрихи в трех направлениях или используйте устройство Retro C80™ для оптимального посева. Выполните штриховку дважды (с погружением в суспензию между штриховками), чтобы обеспечить полное и равномерное покрытие поверхности агара.
- Избыточная влага в чашках перед посевом, недостаточно высушенная поверхность перед наложением тест-полосок и/или неравномерно засеянные штрихом поверхности могут привести к отсутствию сплошного роста, зубчатым краям эллипса, деформированию эллипса или неровному пересечению МИК с полоской. В случае неровного пересечения считывайте большее значение. Если >1 разведения, повторите тест.
- Марка и партия питательной среды RPMI могут влиять на результаты:
  - RPMI 1640, рекомендованная стандартом CLSI® M27-A, поддерживает рост большинства видов *Candida* за исключением нескольких изолятов *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* и *C. parapsilosis*. Медленный рост может потенциально привести к неправильному определению чувствительности, поэтому рекомендуется снимать показания после инкубации в течение 36–48 часов, особенно при слабом росте на протяжении ночи
  - Используйте строго определенную и высококачественную питательную среду RPMI 1640 с глюкозой для поддержки хорошего роста и минимизации чрезмерных стелющихся конечных показателей для азолов. Для обеспечения точных и достоверных показателей МИК марка питательной среды должна иметь хорошую воспроизводимость от партии к партии.
- Период инкубации может влиять на четкость конечных показателей, особенно в случае азолов. При тестировании видов *Candida* с азолами показатели чашек с хорошим ростом желателен считать после 18–24 часов при подтверждении через 36–48 часов.

- В случае итраконазола резистентные результаты могут быть получены через 18–24 часа, но результаты других категорий требуют подтверждения через 36–48 часов.
- При росте вдоль всей тест-полоски, т.е. при отсутствии эллипса ингибирования, укажите МИК как  $\geq$  наивысшее значение шкалы МИК. Когда эллипс ингибирования не достигает полоски (не пересекается с тест-полоской), укажите МИК как < наименьшего значения шкалы МИК.

## Интерпретация

Для интерпретации значений МИК, полученных с помощью метода Etest, можно пользоваться пограничными значениями МИК для определения интерпретируемых категорий, опубликованных CLSI®, а также референсными группами, определенными для данной страны.

Будучи полностью количественным методом определения МИК, Etest дает возможность лаборатории сообщить точные значения МИК вместе с интерпретируемой категорией. Etest определяет значения МИК по непрерывной шкале и может показать результаты в промежуточном положении между традиционными двукратными разведениями, т.е. в полразведения. Если значение МИК по методу Etest находится между стандартными двукратными разведениями, то его следует округлить до ближайшего верхнего значения двукратного разведения перед тем, как категоризовать.

*Пример:* Значение МИК Etest флуконазола в 48  $\mu\text{g}/\text{мл}$  сначала округляется до 64  $\mu\text{g}/\text{мл}$  и категоризируется как резистентность ( $R \geq 64$ ) в соответствии с критериями интерпретации, приведенными в **ТАБЛИЦЕ 1**.

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для проверки действия реактивов Etest, качества питательной среды, посевного материала и используемой техники протестируйте соответствующие референсные штаммы для проведения контроля качества в соответствии с указаниями раздела **ПРОЦЕДУРА**. Реактивы и техника тестирования считаются удовлетворительными, если полученные значения МИК находятся в пределах спецификаций для контроля качества, приведенных в **ТАБЛИЦЕ 1**.

Результаты анализа пациента не следует сообщать, если результаты контрольного теста выходят за пределы утвержденных значений КК. Частота проведения тестирования на проверку контроля качества должна устанавливаться каждой лабораторией индивидуально. Рекомендуется использовать инструкции, приведенные в стандарте CLSI® M27-A.

Пределы значений для контроля качества метода Etest могут отличаться от спецификаций CLSI в некоторых случаях. Пределы значений для КК метода Etest при инкубации в течение 48 часов основываются на обширной базе, собранной при контрольном тестировании большого числа серий реактивов в течение нескольких лет, и включают данные многоцентровых исследований. Смотрите спецификации КК в **ТАБЛИЦЕ 1**.

Если значения МИК для референтных штаммов для проведения контроля качества находятся на полразведения ниже нижнего предела КК, их следует округлить до ближайшего верхнего значения двукратного разведения перед тем, как установить соответствие КК. Подобным образом, если значения МИК находятся на полразведения выше верхнего предела КК, их следует считать несоответствующими КК.

Необходимо проводить регулярный подсчет колоний для проверки того, обеспечивается ли получение суспензии посевного материала надлежащей плотности в КОЕ/мл жизнеспособных бактерий. Например, разведите суспензию 1:1000 и повторно посейте 10  $\mu\text{l}$  в чашке сабурдекстрозного агара и инкубируйте в течение 36–48 часов. Пригодный материал для посева для Etest даст приблизительно от 10 до 50 колоний на чашку, т.е.  $1-5 \times 10^6$  КОЕ/мл.

**Стандарты мутности по шкале МакФарланда не гарантируют правильного количества жизнеспособных бактерий в КОЕ/мл.**

### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Рабочие характеристики метода Etest были установлены при помощи сравнительных оценок, выполненных в трех или более клиниках и в самой компании. В этих исследованиях метод Etest сравнивался с референсным методом микроразведений бульона CLSI®, описанным в стандарте CLSI M27-A2. Необходимое совпадение (EA) значений МИК, полученных при использовании метода Etest и референсного метода, оценивалось как совпадение по двум разведениям. Это общепринятая практика при оценках противогрибкового тестирования, учитывающая общие трудности определения конечных показателей противогрибковой МИК. Category agreement (CA) основывалось на сравнении результатов для интерпретируемых категорий, полученных при обоих методах тестирования.

Данные о рабочих характеристиках приведены в **ТАБЛИЦЕ 1**. Результаты Etest для 24 и 48 часов были сравнимы и продемонстрировали удовлетворительную корреляцию с референсным методом при определении результатов через 48 часов. В случаях, когда совпадение по категориям было ниже необходимого совпадения, обычно это объяснялось кластеризацией результатов МИК для определенных видов вокруг интерпретируемых конечных показателей МИК. Для некоторых штаммов устойчивость к итраконазолу, определяемая референсным методом через 48 часов, лучше выявлялась методом Etest через 48 часов.

### ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Способность метода Etest выявлять устойчивость к вориконазолу у *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* и *Candida tropicalis* неизвестна, так как во время сравнительного тестирования не имелось устойчивых микроорганизмов.
2. Тестирование противогрибковой чувствительности любыми методами, в том числе Etest, требует опыта и должно выполняться только персоналом, знакомым с микологией и проведением тестов противогрибковой чувствительности.
3. Тестирование противогрибковой чувствительности любыми методами, включая Etest, может выполняться только на изолированных колониях.
4. Так как у азолов могут быть различные типы стелющихся конечных показателей, определение МИК может представлять трудности, особенно для неопытного персонала. Чтобы повысить свою квалификацию и надежно выбирать правильные конечные показатели МИК, пользователям следует тренироваться в определении конечных показателей разных типов, сравнивая свои результаты с результатами опытных сотрудников.
5. Могут наблюдаться определенные различия между Etest, основанном на агаре градиентным методом, и методом разведений бульона, основанном на других технических принципах; это объясняется присущими данным методам тестирования характеристиками. Примером является более эффективное выявление методом Etest собственной устойчивости к азолам у *C. krusei* и *C. glabrata*.
6. Как и при всех методах тестирования противогрибковой чувствительности, результаты Etest являются только значениями *in vitro*, и могут указывать на потенциальную чувствительность микроорганизмов *in vivo*. Использование результатов при выборе лечения должно быть единоличным решением и ответственностью лечащего врача, который принимает во внимание медицинский анамнез и все, что ему известно о пациенте, фармакокинетические и фармакодинамические свойства противогрибкового препарата и клинический опыт лечения данным препаратом инфекций, вызванных конкретным грибковым патогеном.

### УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Неиспользованные реактивы можно считать безопасными отходами и утилизировать их соответственно.

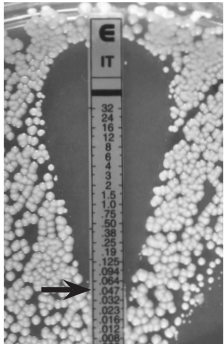
Утилизируйте неиспользованные реактивы и любые другие загрязненные одноразовые материалы в соответствии с процедурой для инфекционных и потенциально инфекционных материалов.

В ответственность лаборатории вменяется обращаться с отходами и сточными водами в соответствии с их природой и уровнем опасности и утилизировать их в соответствии с применимыми нормативами (или пользоваться услугами служб по утилизации отходов).

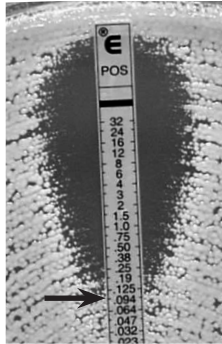
## ИНСТРУКЦИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ETEST

### АЗОЛЫ

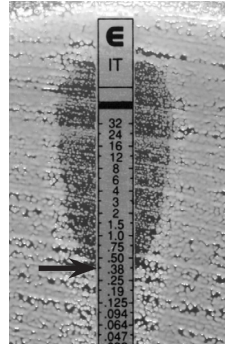
При появлении стелющихся конечных показателей снимайте показания МИК в первой точке значительного ингибирования роста, т.е. в так называемой точке 80 % ингибирования, определяемой невооруженным глазом. Когда стелющийся рисунок ярко выражен, особенно для таких видов, как *C. glabrata* с пониженной чувствительностью к азолам, а также в случае небольших эллипсов при высоких значениях МИК, рассматривайте чашку против яркого источника света, чтобы облегчить визуальное определение конечных показателей в точке 80 % ингибирования.



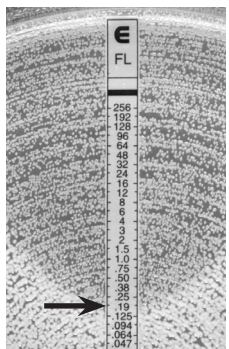
**Рис. 7.**  
*C. albicans*, четкий конечный показатель МИК 0,047 µг/мл



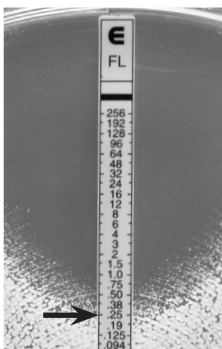
**Рис. 8.**  
*Candida* spp., тонкий эллипс со стелющимися колониями МИК 0,094 µг/мл



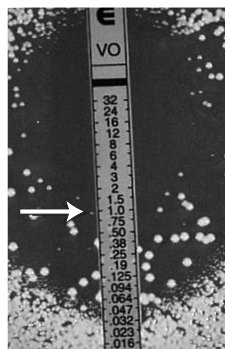
**Рис. 9.**  
*C. tropicalis*, различный эллипс с ростом микроколоний МИК 0,38 µг/мл



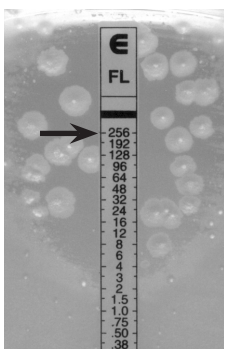
**Рис. 10.**  
*C. albicans*, различный эллипс с ростом микроколоний МИК 0,19 µг/мл



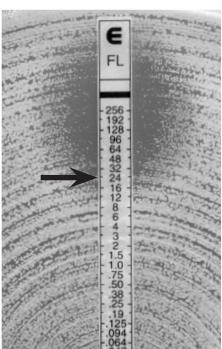
**Рис. 11.**  
*C. parapsilosis*, стелющиеся колонии МИК 0,25 µг/мл



**Рис. 12.**  
*Candida* spp., макроколонии в эллипсе, (потенциальная гетерорезистентность) МИК 1 µг/мл



**Рис. 13.**  
*C. krusei*, макроколонии в эллипсе МИК ≥ 256 µг/мл



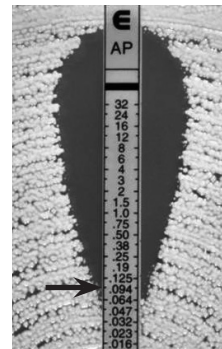
**Рис. 14.**  
*C. glabrata*, высокая МИК со стелющимися колониями МИК 24 µг/мл



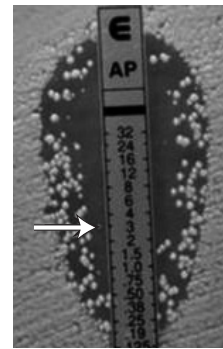
**Рис. 15.**  
*Candida* spp., стелющиеся колонии МИК 0,094 µг/мл

### АМФОТЕРИЦИН В

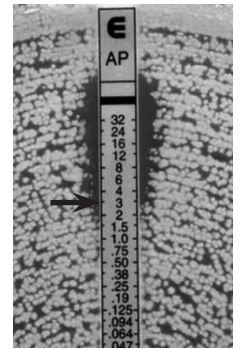
Считывайте конечный показатель в точке полного ингибирования роста, т.е. в точке 100 % ингибирования, включая все микроколонии, зоны помутнения и изолированные колонии.



**Рис. 16.**  
*Candida* spp., четкий конечный показатель МИК 0,094 µг/мл



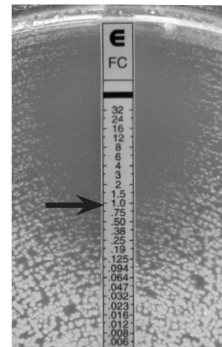
**Рис. 17.**  
*Candida* spp., макроколонии в эллипсе МИК 3 µг/мл



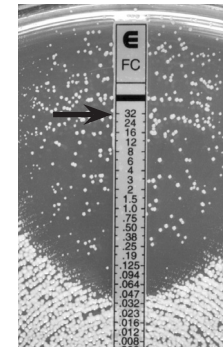
**Рис. 18.**  
*Candida* spp., тонкий эллипс и микроколонии МИК 3 µг/мл

### ФЛУЦИТОЗИН

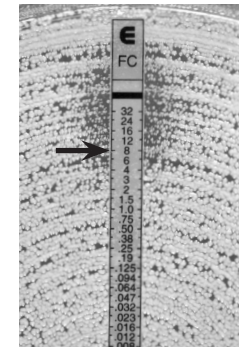
При проявлении стелющихся конечных показателей считывайте МИК прилизительно в точке 90 % ингибирования, определяемой невооруженным глазом. Не обращайте внимания на слабые помутнения и мелкие микроколонии.



**Рис. 19.**  
*C. tropicalis*, стелющиеся колонии МИК 1 µг/мл



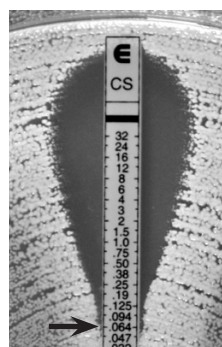
**Рис. 20.**  
*C. albicans*, макроколонии в эллипсе МИК ≥ 32 µг/мл



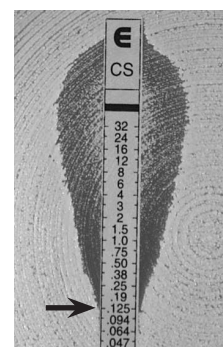
**Рис. 21.**  
*C. albicans*, высокая МИК со стелющимися колониями МИК 8 µг/мл

### ЭХИНОКАНДИНЫ

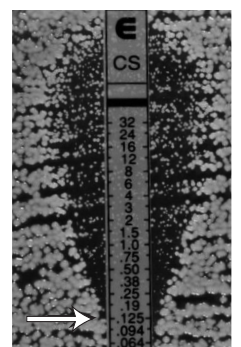
При проявлении стелющихся конечных показателей или других эффектов ингибирования роста считывайте МИК в первой видимой точке значительного ингибирования, т.е. 80 % ингибирования.



**Рис. 22.**  
*C. albicans*, "эффект падения" - считывайте МИК в нижней точке МИК 0,064 µг/мл



**Рис. 23.**  
*C. tropicalis*, эллипс с повторным ростом в диапазоне более высокой концентрации - не обращайте внимания на повторный рост МИК 0,125 µг/мл












**Рис. 24.**  
*Candida* spp., различный эллипс с микроколониями МИК 0,125 µг/мл

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. CLSI M27-A (latest version).
- Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI M38-A (latest edition).
- Pfaller M.A., Messer S.A., Bolmström A., Odds F.C., Rex J.H. (1996). Multi-site reproducibility of the Etest method for Antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology (JCM)*. **34**(7): 1691-1693.
- Espinel-Ingroff A., Pfaller M.A., Erwin M.E., Jones R.N. (1996). Interlaboratory evaluation of Etest method for testing antifungal susceptibilities of pathogenic yeasts to five antifungal agents by using casitone agar and solidified RPMI 1640 medium with 2% glucose. *JCM*. **34**(4): 848-852.
- Pfaller M.A., Messer S.A., Karlsson Å., Bolmström A. (1998). Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *JCM*. **36**(9): 2586-2589.
- Pfaller M.A., Messer S.A., Mills K., Bolmström A., Jones R.N. (2000). Evaluation of the Etest method for determining voriconazole susceptibilities of 312 clinical isolates of *Candida* species by using three different agar media. *JCM*. **38**(10): 3715-3717.
- Pfaller M.A., Messer S.A., Mills K., Bolmström A., Jones R.N. (2001). Evaluation of the Etest method for determining caspofungin susceptibilities of 726 clinical isolates of *Candida* species. *JCM*. **39**(12): 4387-4389.
- Pfaller M.A., Messer S.A., Mills K., Bolmström A., Jones R.N. (2001). Evaluation of the Etest method for determining posaconazole MICs for 314 clinical isolates of *Candida* species. *JCM*. **39**(11): 3952-3954.
- Barry A.L., Pfaller M.A., Rennie R.P., Fuchs P.C., Brown S.D. (2002). Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest and disk diffusion methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC)*. **46**(6): 1781-1784.
- Maxwell M.J., Messer S.A., Hollis R.J., Boyken L., Tendolkar S., Diekema D.J., Pfaller M.A., and the International Fungal Surveillance Participant Group. (2003). Evaluation of Etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood. *JCM*. **41**(3): 1087-1090.
- Pfaller M.A., Diekema D.J., Messer S.A., Boyken L., Hollis R.J. (2003). Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion and Etest methods: Report from Artemis global antifungal susceptibility program 2001. *JCM*. **41**(4): 1440-1446.
- Pfaller M.A., Diekema D.J., Boyken L., Messer S.A., Tendolkar S., Hollis R.J. (2003). Evaluation of Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *C. glabrata* to fluconazole and voriconazole. *JCM*. **41**(5): 1875-1880.
- Pfaller M.A., Messer S.A., Mills K., Bolmstrom A., Jones R.N. (2001). Evaluation of Etest method for determining caspofungin (MK-0991) susceptibilities of 726 clinical isolates of *Candida* species. *JCM*. **39**(12): 4387-4389.
- Laverdiere M., Restieri C., Habel F. (2002). Evaluation of the *in vitro* activity of caspofungin against bloodstream isolates of *Candida* species from cancer patients: comparison of Etest and NCCLS reference methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **20**(6): 468-471.

## ТАБЛИЦА СИМВОЛОВ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Символ	Значение
	Номер по каталогу
	Для лабораторной диагностики <i>in vitro</i>
	Произведено
	Температурные ограничения
	Верхняя температурная граница
	Использовать до
	Номер партии
	Перед использованием прочтите инструкцию
	Содержимого достаточно для <n> тестов

BIOMERIEUX, голубой логотип, Etest, тест-полоски Etest с градиентом, LyfoCults, Nema C88, Retro C80 и Simplex C76 являются используемыми, находящимися в процессе регистрации и/или зарегистрированными торговыми марками, принадлежащими компании bioMérieux или одной из ее компаний или дочерних компаний. CLSI является зарегистрированной торговой маркой, принадлежащей Clinical Laboratory and Standards Institute, Inc. Торговая марка и торговое наименование ATCC и все каталожные номера ATCC являются торговыми марками компании American Type Culture Collection. Другие названия и торговые марки являются собственностью их соответствующих владельцев.