



INDEX, ÍNDICE, EYPETHPIO

1-11	ENGLISH
12-23	ESPAÑOL
24-35	ITALIANO
36-47	DEUTSCHE
48-59	ΕΛΛΗΝΙΚΟ
60-71	FRANÇAIS
72-73	SYMBOLS SIMBOLOS SIMBOLI SYMBOL SYMBOLES ΣΥΜΒΟΛΟ SIMBOLIS SYMBOLY



SENSITITRE®
YEASTONE®
For *in vitro* Diagnostic Use

For full plate information, including plate layout, QC information please refer to www.trekds.com/techinfo. The plate code and batch number will be required.

INTENDED USE

The Sensititre® susceptibility system is an *in vitro* diagnostic product for susceptibility testing of non-fastidious yeast including *Candida* species, *Cryptococcus* species, *Aspergillus* species and miscellaneous other rapid growing yeast species.

It is a micro broth method that provides qualitative quantitative Minimum Inhibitory Concentration (MIC) results in a dried plate format. TREK Diagnostic Systems manufactured broth has only been validated with Sensititre® Products.

PRINCIPLES OF USE

The Sensititre® yeast susceptibility test is a colorimetric microdilution test. Each plate is dosed with antifungal agents at appropriate dilutions, and a colorimetric indicator.

Results are read manually by observing the lowest antifungal concentration showing inhibition of growth (as evidenced by no color change).

PRECAUTIONS

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

Only personnel trained in susceptibility testing techniques should use the system

Since living microorganisms used with this product can be infectious to the user, proper handling and disposal methods should be used.

STORAGE AND SHELF LIFE

The 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 past its expiration date, or the desiccant color is not blue or orange or the foil pouch is damaged.

Inoculate the plate within 5 hours of removal from the pouch.

PROCEDURE

Materials Included:

YeastOne® susceptibility plate

Adhesive seal

Materials Not Included [TREK Inc Product code]:

Sensititre® demineralised water [T3339]

Sensititre® yeast susceptibility inoculum broth [Y3462]

Sensititre® doseheads (for use with AutoInoculator®/AIM®) [E3010]

Sensititre® AutoInoculator®[V3010]/ Sensititre® AIM® [V3020]

Sensititre® Vizion® [V2021]

Sensititre® Nephelometer® [V3011]

Manual Viewer [V4007]
0.5 McFarland turbidity standard [E1041]
Bacteriological loop
20 μ l pipette
Sterile inoculum reservoir
100 μ l pipettor and disposable tips
Quality control strains
Fungal growth medium agar plates e.g Sabauroid dextrose agar (SDA)
Incubator 34-36°C, non-CO₂
Vortex mixer
Current CLSI documents
Aspergillus spp only
Takashio or potato dextrose agar
Cotton Swab
Sterile saline with 0.05% Tween 20
Spectrophotometer

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Specimens should be collected, transported, stored and then plated on to primary isolation medium to give isolated colonies using standard procedures. (1)

SELECTION OF SUSCEPTIBILITY TEST BROTH

Sensititre® approved broths are performance tested for use in Sensititre® susceptibility products.

INOCULATION PROCEDURE (*Candida* and *Cryptococcus* spp.)

Allow all broths to come up to room temperature before use.

A final organism density of approximately 1.5 - 8 X 10³ CFU/ml is recommended.

1. Pick several well-isolated colonies of >1mm diameter from a pure 24-hour culture of the Yeast isolate, and emulsify into sterile water. Vortex mix the suspension for 15 seconds, ensuring that the suspension is uniform. If clumping occurs, allow them to settle before adjusting the density. Adjust to a 0.5 McFarland standard visually or using a Sensititre® Nephelometer®
 2. Transfer 20 μ l of the suspension into 11 ml of YeastOne® inoculum broth, to give an inoculum of 1.5 - 8 X 10³ CFU/ml.
- Steps 1 and 2 should be completed in 15 minutes.
3. Transfer 100 μ l by either:
 - a. **Sensititre® AutoInoculator®/ Sensititre AIM®.** Replace the tube cap with a Sensititre® single-use dosehead and inoculate the plate according to the AutoInoculator® /AIM® instructions.

Remove the test tube dosehead combination from the AutoInoculator® /AIM® 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.

Inoculate broth into a plate within 15 minutes.

4. A check of the colony count should be done by removing 10 μ l from the positive control well and plating onto Sabauroid dextrose agar (SDA). A correct inoculum will produce 10-80 colonies.

5. Cover all wells with the adhesive seal. Avoid creases as these can lead to skips.

INOCULATION PROCEDURE (*Aspergillus* spp.) (5-7, 22)

Allow all broths to come up to room temperature before use.

1. Subculture from Sabouraud dextrose agar onto Tasashio or potato dextrose agar. Incubate for 7 days at 35°C to obtain adequate sporulation.
 2. Collect conidia with a cotton swab and suspend in sterile saline with Tween.
 3. 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 (22).
 6. Add 100µl to 11ml of YeastOne® inoculum broth to give a final inoculum of $0.5-5 \times 10^4$ cfu/ml.
 7. Transfer 100µl by either:
 - a. **Sensititre® AutoInoculator®/Sensititre® AIM®**. Replace the tube cap with a Sensititre® single-use dosehead and inoculate the plate according to the AutoInoculator®/AIM® instructions.
- Remove the test tube dosehead combination from the AutoInoculator® /AIM® 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.
Inoculate broth into a plate within 15 minutes.
 8. A check of the colony count should be done by removing 10µl from the positive control well and plating onto Sabauroid dextrose agar (SDA). A correct inoculum will produce 50-500 colonies.
 9. Cover all wells with the adhesive seal. Avoid creases as these can lead to skips.

INCUBATION

Minimally incubate the plates for 24-25 hours at 35°C in a non-CO₂ incubator.

Cryptococcus species should be incubated for 72 hours.

Aspergillus species should be incubated for 48 to 72 hours.

Incubation at temperatures over 35°C may affect the performance of these plates.

Up to 3 plates can be stacked if not incubated in the ARIS®.

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 Vizion 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 yeasts may not change the indicator completely to red, but display more of a purpling of the indicator. Some organisms may show a slight purpling in posaconazole, voriconazole, fluconazole, itraconazole and ketoconazole. (see details for reading below).

1. Examine the positive growth well after 24 hours incubation (*Candida* species). If the growth well is red, the endpoints for the antifungals can be interpreted. If the well is still blue or only faintly purple, re-incubate for an additional 24 hours and re-examine.

DO NOT READ TURBIDITY IN THE SENSITITRE YEASTONE® PLATES.**Read Only Color Change.**

2. The MIC is the lowest concentration of an antifungal agent that substantially inhibits growth of the organism as detected by a color change. The amount of color change in the wells containing the agent should be compared to the color of the positive growth-control wells
3. No growth occurs when there is no change in the blue indicator in any dilution of an antifungal. The organism is susceptible to the lowest concentration of antifungal
4. The MIC is recorded as the lowest concentration of antifungal agent preventing the development of a red or purple growth well, i.e. first blue. .
5. The organism is resistant to the highest concentration of antifungal when growth is seen in all wells. The MIC endpoint should be recorded as "greater than" (>) the highest concentration.
6. For *Aspergillus* species read the MIC as the lowest concentration with a blue color.

INTERPRETATION OF RESULTS**TABLE 2. Illustration and the interpretation of test results that may occur**

Well Concentration µg/ml	1	2	4	8	16	32	R = RED: Positive growth indication B = BLUE: Negative growth indication
A.	R	R	R	B	B	B	Typical growth pattern; MIC endpoint is 8 µg/ml.
B.	R	R	R	R	R	R	Growth in all wells; MIC endpoint is >32 µg/ml.
C.	B	B	B	B	B	B	No growth in any well; MIC endpoint is ≤1 µg/ml.
D.	R	R	R	B	R	R	"Skipped Well". MIC endpoint is >32 µg/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

¹ With careful technique these occurrences are uncommon.

READING NOTES

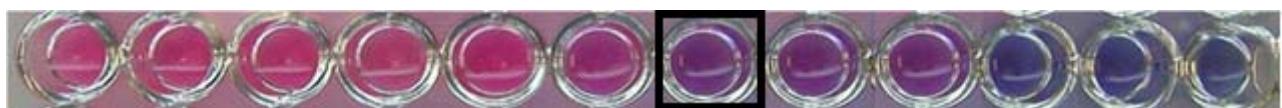
Amphotericin B. For amphotericin B at 24 hours, the endpoints are typically easily defined and the MIC is read as the lowest drug concentration that prevents any discernible color change. Trailing endpoints with Amphotericin B are not usually encountered.

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. The 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:

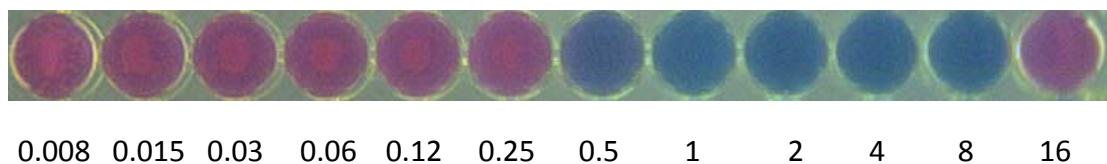
Itraconazole can occasionally come out of solution at concentrations of $\geq 4 \mu\text{g/ml}$. This can result in the affected well exhibiting growth and turning red.



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

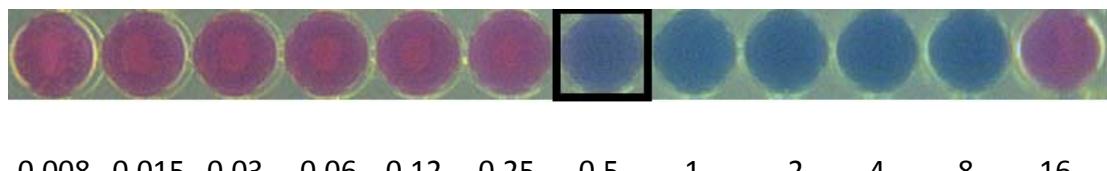
The paradoxical effect also known as the Eagle phenomenon refers to an observation where an increase in the antimicrobial concentration beyond a certain point paradoxically

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 +441342318777 or email techsupport@trekds.co.uk.

Alternatively please contact +1-800-871-8909 or email techsupport@trekds.com in the USA.

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 according to local guidelines (1). 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

For user quality control of the MIC system, the following culture(s) from the American Type Culture Collection (ATCC®) are recommended:

<i>Candida krusei</i> *	ATCC® 6258
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC® 22019

*ATCC now lists these organisms as *Issatchenkia orientalis*.

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

Expected QC values are provided in Table 3

Contact Sensititre® Distributor or TREK Diagnostic Systems in the event that quality control discrepancies cannot be resolved.

TABLE 3. Recommended 24 and 48-hour MIC ranges ($\mu\text{g/ml}$) or Quality Control strains.

Ranges that are different from CLSI quality control ranges are underlined (1).

Antifungal Agent	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258		<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	
	24 hour	48 hour	24 hour	48 hour
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>
5-Flucytosine	4 - 16	8 - 32	<u>0.12 - 0.5</u>	0.12 - 0.5
Itraconazole	0.12 - 1	0.25 - 1	0.12 - 0.5	0.12 - 0.5
Ketoconazole	0.12 - 1	0.25 - 1	0.03 - 0.25	0.06 - 0.5
Micafungin	<u>0.06 - 0.25</u>	0.12 - 0.5	0.5 - 2	0.5 - 4
Posaconazole	0.06 - 0.5	0.12-1	0.06 - 0.25	0.06 - 0.25
Voriconazole	0.06 - 0.5	0.12 - 1	0.015 - 0.12	0.03 - 0.25

TABLE 4. MIC Interpretative Criteria ($\mu\text{g/ml}$) for *Candida* Species as per CLSI M27

Antifungal Agent	Susceptible	Susceptible dose dependent	Intermediate	Resistant	Non-susceptible
Anidulafungin	<u>≤ 2</u>				> 2
Caspofungin	<u>≤ 2</u>				> 2
Fluconazole*	<u>≤ 8</u>	16 - 32		≥ 64	
5-Flucytosine	<u>≤ 4</u>		8 - 16	≥ 32	
Itraconazole	<u>≤ 0.125</u>	0.25 - 0.5		≥ 1	
Micafungin	<u>≤ 2</u>				> 2
Voriconazole	<u>≤ 1</u>	2		≥ 4	

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

NOTE 1: Shown are the breakpoints ($\mu\text{g/mL}$) for *Candida* spp. Against the indicated agents. If minimal inhibitory concentrations (MICs) 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 $\mu\text{g/mL}$ would be placed in the S-DD category.

Please refer to CLSI (1) 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® 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, review of CLSI Antifungal Susceptibilities Standard M27 is encouraged.

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® 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 (6).
13. Correlation of the MIC for Caspofungin to the treatment outcome following caspofungin use has not been fully established. (9)
14. Performance of the YeastOne® 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 YeastOne® with Posaconazole with Cryptococcus has not been established.
16. Only instruments supported by Sensititre i.e. a simple mirror viewer, Sensitouch, Vizion, Sensititre Autoreader , Optiread and ARIS instruments 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 either manually or are designed to give comparable performance to CLSI reference microbroth procedure. Comparable performance is defined as \geq 90% agreement to within a doubling dilution of the reference MIC (1).

For further information contact TREK Diagnostic systems or your local distributor

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.
- (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., Holiday, 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, posaconazole 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) Holiday, 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-Infogroff, 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 TREK Technical services.



Manufactured by TREK Diagnostic Systems
Units 17-19 Birches Industrial Estate, East Grinstead,
West Sussex. RH19 1XZ, UK.
Tel: +44- 1342-318777

Distributed by TREK Diagnostic Systems,
982 Keynote Circle, Suite 6, Cleveland, Ohio 44131
Technical Service USA: 1 (800) 642-7029



029-Yeast -ROW IVD-GB_V2.0
Date updated: 6 August 2012



SENSITITRE®
YEASTONE®

Para uso diagnóstico *in vitro*

Para información completa sobre la placa, incluyendo su composición, el control de calidad, visite la página www.trekds.com/techinfo. Se le solicitará el código de placa y número de lote.

APLICACIONES PREVISTAS

El sistema de sensibilidad Sensititre® es un producto de diagnóstico *in vitro* para la realización de pruebas de sensibilidad a levaduras no exigentes como especies de *Candida*, *Cryptococcus* y otras especies de levadura de rápido crecimiento.

Es un método de microdilución que ofrece resultados cualitativos y cuantitativos de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en formato de placa seca. El caldo fabricado por TREK Diagnostic Systems sólo ha sido validado con Productos Sensititre®.

PRINCIPIOS DE USO

La prueba de sensibilidad a levaduras Sensititre® es una prueba de microdilución colorimétrica. Cada placa contiene diversos agentes antifúngicos en las diluciones correspondientes y un indicador colorimétrico. Los resultados se leen manualmente observando la concentración antifúngica más baja, que muestra la inhibición del crecimiento (que viene indicada por la ausencia de cambio de color).

PRECAUCIONES

Los resultados se utilizarán como ayuda para seleccionar el fármaco adecuado para el tratamiento.

Únicamente el personal formado en técnicas de pruebas de sensibilidad debe utilizar el sistema.

El producto puede utilizarse con microorganismos patógenos, por lo que deben emplearse métodos adecuados para su manejo y eliminación.

ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

Las placas deben almacenarse a temperatura ambiente (15-25°C), alejadas de la luz solar y el calor directos. Cada placa está embalada en papel de aluminio con un desecante de gel de sílice. No utilizar el panel o el caldo a) después de su fecha de caducidad b) si el desecante no presenta color azul, o naranja o c) si la envoltura está dañada.

Inocular la placa antes de transcurridas 5 horas desde su apertura.

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados:

Placa de sensibilidad YeastOne®

Láminas adhesivas

Materiales necesarios pero no suministrados [Referencia TREK Inc de producto]:

Agua desmineralizada Sensititre® [T3339]

Caldo de cultivo para determinación de sensibilidad de levaduras Sensititre® [Y3462]

Cabezales dosificados Sensititre® (para utilizar con Autolnoculator®/ AIM® [E3010]

Autolnoculator® Sensititre® [V3010]/ AIM Sensititre® [V3020]

Sensititre® Vizion® [V2021]

Sensititre® Nephelometer® [V3011]

Visor manual [V4007]

Estándar de turbidez McFarland 0,5 [E1041]

Asa de siembra

Pipeta de 20µl

Recipiente de inóculo estéril

Pipeta de 100ul y puntas desechables

Cepas de control de calidad

Placas de agar de medio de crecimiento fúngico ej.: Agar dextrosa Sabauroud (SDA)

Incubadora 34-36 °C, no de CO₂

Mezclador de vórtex

Documentos actuales CLSI

Sólo para *Aspergillus* spp

Agar Takashio patata-dextrosa

Hisopos de algodón

Solución salina estéril con Tween 20 (0,05%)

Espectrofotómetro

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras deben obtenerse, transportarse, almacenarse y sembrarse en placas en un medio de aislamiento primario que proporcione colonias aisladas mediante procedimientos estándar (1).

SELECCIÓN DEL CALDO DE PRUEBA DE SENSIBILIDAD

El rendimiento de los caldos de cultivo autorizados por Sensititre® está comprobado para su uso en los productos de sensibilidad Sensititre®.

PROCEDIMIENTO DE INOCULACIÓN (*Candida* spp y *Cryptococcus*.)

Antes de usar deje que todos los caldos adquieran la temperatura ambiente.

Se recomienda una densidad final de organismo de unos 1,5 - 8 X 10³ UFC/ml

1. Seleccione varias colonias bien aisladas de >1mm de diámetro de un cultivo puro de 24 horas del aislado de levaduras y emulsifique en agua estéril. Mezcle en vórtex la suspensión durante 15 segundos y asegúrese de que la suspensión sea uniforme. Si se producen coágulos, deje asentar la suspensión antes de ajustar la densidad. Ajuste visualmente a un estándar McFarland 0,5 o utilice un nefelómetro Sensititre®.

2. Transfiera 20 µl de la suspensión a 11 ml de caldo de inóculo YeastOne® para obtener un inóculo de 1,5 - 8 X 10³ UFC/ml.

Los pasos 1 y 2 se deben completar en 15 minutos.

3. Transfiera 100µl a cada pocillo por medio de cualquiera de los siguientes equipos:

a. **Autolnoculator® Sensititre®/AIM® Sensititre®**. Sustituya el tapón del tubo por un cabezal de dosis de un solo uso Sensititre® e inocule la placa según las instrucciones del Autolnoculator®/AIM®.

Retire la combinación de cabezal dosificador-tubo de ensayo del Autolnoculator® en 30 segundos de haber dosificado una placa y proceda a desecharlo o almacenarlo boca abajo en un soporte.

b. **Pipeta manual.** Vierta el caldo en una batea estéril e inocule la placa por medio de una pipeta adecuada.

Inocule el caldo en una placa antes de 15 minutos.

4. Debe realizarse una comprobación del número de colonias extrayendo 10µl del pocillo de control positivo y colocando en una placa de agar dextrosa Sabauroud (SDA). Un inóculo correcto producirá 10-80 colonias.

5. Cubra todos los pocillos con una lámina adhesiva. Evite la formación de arrugas, ya que se pueden producir saltos.

PROCEDIMIENTO DE INOCULACIÓN (*Aspergillus* spp.) (5-7, 22)

Antes de usar deje que todos los caldos adquieran la temperatura ambiente.

1. Efectuar un subcultivo sobre agar Takashio o patata-dextrosa. Incubar durante 7 días a 35°C para obtener una esporulación adecuada.

2. Recoger conidios con un hisopo de algodón y suspenderlos en salino estéril co Tween.

3. Dejar que sedimenten las partículas de mayor tamaño durante 3-5 minutos.

4. Recoger el sobrenadante y homogeneizarlo usando un agitador tipo vórtex.

5. Utilizando un espectrofotómetro, ajustar la turbidez del sobrenadante a un valor de transmitancia del 80-82% a 530nm, equivalente a un inóculo de $0,6-5 \times 10^6$ cfu/ml. Otra posibilidad sería ajustar hasta el 0,5 del estándar McFarland (22).

6. Transferir 100 µl a un tubo de 11 ml de caldo YeastOne® para obtener un inóculo final de $0,5-5 \times 10^4$ cfu/ml.

7. Transferir 100µl a cada pocillo por medio de cualquiera de los siguientes equipos:

a. **Autolnoculator® Sensititre®/AIM® Sensititre®.** Sustituya el tapón del tubo por un cabezal de dosis de un solo uso Sensititre® e inocule la placa según las instrucciones del Autolnoculator®/AIM®.

Retire la combinación de cabezal dosificador-tubo de ensayo del Autolnoculator®/AIM® en 30 segundos de haber dosificado una placa y proceda a desecharlo o almacenarlo boca abajo en un soporte.

b. **Pipeta manual.** Vierta el caldo en una batea estéril e inocule la placa por medio de una pipeta adecuada.

Inocule el caldo en una placa antes de 15 minutos.

8. Debe realizarse una comprobación del número de colonias extrayendo 10µl del pocillo de control positivo y colocando en una placa de agar dextrosa Sabauroud (SDA). Un inóculo correcto producirá 50-500 colonias.

9. Cubra todos los pocillos con una lámina adhesiva. Evite la formación de arrugas, ya que se pueden producir saltos.

INCUBACIÓN

Incubar las placas como mínimo durante 24-25 horas a 35°C en una incubadora que no sea de CO₂.

Las especies de *Cryptococcus* deben ser incubadas durante 72 horas.

Aspergillus spp. deberá incubarse de 48-72 horas.

La incubación a temperaturas superiores a 35°C puede influir en el rendimiento de estas placas.

Se pueden apilar hasta 3 placas si no se incuban en el ARIS®.

LECTURA DE LOS RESULTADOS DE PRUEBAS

Las placas se pueden leer visualmente con la iluminación normal de un laboratorio, empleando un visor manual con espejo o utilizando el sistema Sensititre Vizion® System. Para obtener información adicional, consulte el Manual del usuario de Vizion. El crecimiento de levaduras en soluciones antifúngicas se percibirá como un cambio en el indicador de crecimiento colorimétrico de azul (negativo) a rojo (positivo). Es posible que algunas levaduras no cambien totalmente el indicador a rojo, sino a un indicador de color morado. Algunos organismos pueden mostrar un ligero color morado en posaconazol, voriconazol, fluconazol, itraconazol y ketoconazol. (Véase la información de lectura a continuación)

1. Examine el pocillo de crecimiento positivo después de 24 horas de incubación. (*Candida* spp). Si el pocillo de crecimiento es rojo, se pueden interpretar los puntos finales de los agentes antifúngicos. Si el pocillo es azul o ligeramente morado, vuelva a incubar durante otras 24 horas y examine de nuevo.

NO LEA LA TURBIDEZ EN LAS PLACAS SENSITITRE YEASTONE®.

Lea sólo el cambio de color.

2. La CIM es la concentración más baja de agente antifúngico que inhibe sustancialmente el crecimiento del organismo que puede detectarse por medio de un cambio de color. El nivel de cambio de color en los pocillos que contienen el agente debe compararse con el color de los pocillos de control de crecimiento positivo.

3. Cuando no hay cambio en el indicador azul en ninguna dilución de agente antifúngico, no se produce crecimiento. El organismo es sensible a la concentración más baja de antifúngico.

4. La CIM se registra como la concentración más baja de agente antifúngico que impide el desarrollo de un pocillo de crecimiento rojo o morado y corresponde al primer pocillo azul.

5. Cuando se observa crecimiento en todos los pocillos, el organismo es resistente a la concentración más alta de antifúngico. El punto final de la CIM debe registrarse como "mayor que" (>) la concentración más alta.

6. Para *Aspergillus* spp. lea la CIM como la menor concentración que presenta color azul.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

TABLA 2. Ilustración e interpretación de los resultados de prueba que pueden darse

Concentración de pocillo µg/ml							R = ROJO: Indicativo de crecimiento positivo
	1	2	4	8	16	32	
A.	R	R	R	B	B	B	Pauta de crecimiento típica. El punto final de la CIM es 8 µg/ml.
B.	R	R	R	R	R	R	Crecimiento en todos los pocillos; el punto final de la CIM es >32 µg/ml.
C.	B	B	B	B	B	B	No hay crecimiento en ningún pocillo; el punto final de la CIM es \leq 1 µg/ml.
D.	R	R	R	B	R	R	“Pocillo saltado”. La CIM es >32 µg/ml. si existe crecimiento en los pocillos de cualquier lado. Si se produce más de un “salto” en una columna, los resultados de prueba no serán válidos ¹
E.	R	R	B	B	R	R	“Pocillo saltado” doble. La prueba debe repetirse ¹

¹ Estas situaciones no son frecuentes si las técnicas se ejecutan con cuidado.

NOTAS DE LECTURA

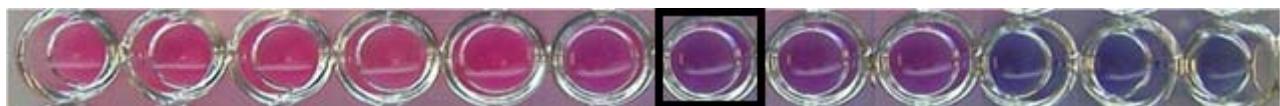
Anfotericina B. Para la anfotericina B a 24 horas, los puntos finales suelen definirse de forma fácil y la CIM se lee como la concentración de fármaco más baja que impide un cambio de color perceptible. Normalmente no se encuentran puntos finales de crecimiento residual (trailing) con la anfotericina B.

La MIC se corresponde al primer pocillo que muestra un cambio de color obvio comparado con el pocillo de crecimiento positivo.



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 menos precisos a causa del crecimiento terminal y pueden ser una fuente importante de variabilidad. Se produce *trailing* cuando se mantiene un ligero cambio de color que, en ocasiones, es idéntico para todas las concentraciones de fármaco por encima de la CIM. La CIM debe leerse como el primer pocillo que muestra un cambio de color menos intenso en comparación con el pocillo de control de crecimiento positivo. Las cepas de referencia de una sensibilidad definida también pueden resultar de ayuda para la formación del personal. Se considera que los aislados de *Candida krusei* se mantendrán intrínsecamente resistentes al fluconazol y que su CIM no debe ser interpretada, (1) debe adjuntarse un comentario al resultado de prueba indicado.

Puntos finales con *trailing*: Esto sucede cuando persiste un ligero cambio de color y a menudo es idéntico en varias concentraciones. La lectura de la MIC debe ser el primer pocillo que muestra un cambio de color menos intenso comparado con el pocillo de control de crecimiento positivo.



Equinocandinas. Los puntos finales del CIM (circuito integrado de microondas) serán determinados después de 24 horas de incubación a 35°C. El CIM deberá leerse como el primer pozo que muestra un cambio de color menos intenso cuando se compara con el pozo de control positivo.



Itraconazole:

A veces, itraconazole puede aparecer en la solución en concentraciones de $\geq 4 \mu\text{g/ml}$. Esto puede hacer que el pocillo afectado muestre crecimiento y se vuelva rojo.



En ocasiones encontramos un crecimiento paradójico en las concentraciones más altas de itraconazol en los paneles para sensibilidad a levaduras Sensititre, que produce que estos pocillos se tiñan de rosa.

El efecto paradójico también conocido como fenómeno de Eagle se refiere a una observación en la que un aumento de la concentración antimicrobiana más allá de cierto punto produce, paradójicamente, un aumento del número de bacterias que sobreviven. Una explicación podría ser que, como la concentración es demasiado alta, el agente podría ser un autoantagonista del receptor con el que se liga (la penicilina que se liga a proteínas, por ejemplo, en el caso de una penicilina).



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

Solución

El crecimiento de la alta concentración debe ignorarse, a menos que exista crecimiento en todas las demás concentraciones de itraconazol. En el siguiente ejemplo, el pocillo de $0,5 \mu\text{g/ml}$ resaltado con el cuadrado negro es donde debe registrarse el resultado de CMI.



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

Si tiene cualquier otra duda o pregunta, póngase en contacto con el departamento de asistencia técnica llamando al +441342318777 o escribiendo a techsupport@trekds.co.uk. Otra posibilidad es llamar al +1-800-871-8909 o escribir a techsupport@trekds.com en los EE. UU.

Contaminación / Saltos

Otra posibilidad es que un pocillo (de crecimiento) rosa entre pocillos (sin crecimiento) azules sea un indicio de contaminación. Debe realizarse un subcultivo del contenido del pocillo para determinar la causa.

Un pocillo azul en una serie de pocillos de crecimiento rojos es señal de un “salto” y debe ignorarse. La MIC debe leerse por encima de todo pocillo con salto. Si hay más de un pocillo con saltos, **no** deberá informarse del antifúngico.



CONTROL DE CALIDAD

La frecuencia de las pruebas de control de calidad debe ajustarse a las directrices locales (1).

El inóculo debe cultivarse en un medio adecuado con el fin de comprobar su pureza. Los resultados de las pruebas no son válidos si se detecta un cultivo mixto.

Todas las placas Sensititre® incluyen pocillos de control positivo. Las pruebas no son válidas a menos que exista crecimiento definido en todos los pocillos de control positivo.

Para un control de calidad del usuario del sistema de CIM, se recomiendan los siguientes cultivos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC®):

<i>Candida krusei</i> *	ATCC® 6258
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC® 22019

*ATCC incluye estos organismos como *Issatchenka orientalis*.

Los resultados **no** deben ser informados si los resultados del control de calidad no están dentro del intervalo.

Valores de control de calidad previstos en la Tabla 3

Póngase en contacto con el distribuidor de Sensititre® o con TREK Diagnostic Systems en caso de que no se puedan resolver las discrepancias del control de calidad.

TABLA 3. Intervalos de CIM recomendados de 24 y 48 horas para cepas de control de calidad ($\mu\text{g/ml}$).

Los valores subrayados indican diferencias o adiciones a los rangos de control de calidad publicados (1).

Agente Antifúngico	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258		<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
Posaconazol	0.06 - 0.5	0.12-1	0.06 - 0.25	0.06 - 0.25
Anfotericina B	0.5 - 2	1-4	0.25 - 2	0.5 - 4
Fluconazol	8 - 64	16 - 128	0.5-4	<u>2 - 8</u>
Itraconazol	0.12 - 1	0.25 - 1	0.12 - 0.5	0.12 - 0.5
Ketoconazol	0.12 - 1	0.25 - 1	0.03 - 0.25	0.06 - 0.5
5 - Flucitosina	4 - 16	8 - 32	<u>0.12 - 0.5</u>	0.12 - 0.5
Voriconazol	0.06 - 0.5	0.12 - 1	0.015 - 0.12	0.03 - 0.25
Micafungina	<u>0.06 - 0.25</u>	0.12 - 0.5	0.5 - 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

TABLA 4. Criterios interpretativos de CIM ($\mu\text{g/ml}$) para especies *Candida* (CLSI M27)

Agente Antifúngico	Sensible	Sensible dosis-dependiente	Intermedio	Resistente	No Sensible
Anidulafungina	<u><2</u>				>2
Caspofungina	<u><2</u>				>2
Fluconazol*	<u><8</u>	16 - 32		<u>>64</u>	
Itraconazol	<u><0.125</u>	0.25 - 0.5		<u>>1</u>	
Micafungina	<u><2</u>				>2
Flucitosina	<u><4</u>		8 - 16	<u>>32</u>	
Voriconazol	<u><1</u>	2		<u>>4</u>	

Se considera que las cepas clínicas de *Candida krusei* son intrínsecamente resistentes al fluconazol y sus concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) no deben interpretarse de acuerdo con esta escala

NOTA 1: Se muestran los puntos de ruptura ($\mu\text{g/mL}$) para el la especie *Candida*. Contra los agentes indicados. Si se miden las CIM con una escala que produce resultados descendentes entre categorías, se implica a la categoría superior siguiente. Por lo tanto, una cepa clínica con una CIM de fluconazol de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ sería ubicada en la categoría susceptible y dosis-dependiente (S-DD).

Consulte el CLSI (1) para obtener más información sobre la interpretación de los resultados

LIMITACIONES

1. Las placas Sensititre YeastOne® se utilizan con levaduras no exigentes, como *Candida*, *Cryptococcus* y otras especies de levaduras de crecimiento rápido. Estas placas no están destinadas para levaduras exigentes o de crecimiento lento, tales como *Histoplasma* o *Blastomyces* y hongos filamentosos.
2. Se ha evaluado la comparación entre Sensititre YeastOne® a 24 horas y el método de referencia CLSI a 48 horas. Sin embargo, se observan porcentajes altos de error debido a la dificultad para correlacionar los puntos finales de los organismos trailing (*C. albicans*) con una incubación de 48 horas.
3. Las pruebas de los hongos y agentes antifúngicos son intrínsecamente menos precisas que las pruebas de bacterias.
4. Algunos investigadores consideran que la lectura a las 24 horas es más precisa que la lectura a las 48 horas debido al problema del *trailing* con determinados aislados. El estándar oficial CLSI indica que las lecturas deben realizarse a las 48 horas. Hasta que no se obtengan y analicen datos suficientes, la cuestión de cuál es el tiempo de lectura más relevante clínicamente sigue sin resolverse. El informe de los resultados debe indicar claramente los tiempos de lectura.
5. Para obtener información adicional, se recomienda revisar el estándar M27 de sensibilidad antifúngica CLSI .
6. El cambio de color indica el punto final, no la turbidez (este hecho atenua algunos problemas con respecto a la interpretación de determinadas especies de *Candida* debido al *trailing*. El *trailing* se observa más comúnmente con aislados diferentes de la sangre y otros fluidos corporales estériles).
7. No realice la lectura a las 24 horas si el pocillo de control no ha cambiado totalmente a positivo.
8. No se ha determinado el rendimiento del voriconazol con especies de *Cryptococcus* y especies de levaduras de crecimiento. La CIM del voriconazol sólo debe notificarse en caso de especies de *Candida*.
9. Utilícese sólo con caldo de inóculo Sensititre® autorizado de sensibilidad a levaduras. El uso de otros caldos de cultivo podría ocasionar errores.
10. Al igual que con cualquier método de pruebas de sensibilidad *in vitro*, los resultados de las pruebas deben correlacionarse con la respuesta clínica del paciente al tratamiento prescrito.
11. Para *Aspergillus* spp, únicamente se ha verificado el rendimiento frente a Anfotericina B, Itraconazol Posaconazol y Voriconazol.
12. La referencia bibliográfica 5 muestra un alto nivel de concordancia (>99%) con el método CLSI para *Aspergillus* spp frente a Anfotericina B. Se observan concordancias menores con Itraconazol. *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. terreus* muestran concordancias >90%, siendo éstas de 85% para *A. nidulans* y de 33% para *A. ustus*, en paneles incubados durante 48 y preparados con inóculos de 10^3 cfu/ml. Se observa concordancia superior al 90% en itraconazol y anfotericina B empleando inóculos de 10^4 cfu/ml e incubaciones de 72 horas. (6).
13. No ha sido completamente establecida la correlación entre los valores de CIM frente a la caspofungina y su eficacia terapéutica. (9)
14. No ha sido establecida la capacidad del panel YeastOne® para testar Anidulafungina, Caspofungina y Micafungina frente a *Cryptococcus*, *Aspergillus* o levaduras de crecimiento

rápido **distintas de especies de Candida**. En consecuencia, la CIM de Anidulafungina, Caspofungina y Micafungina sólo deberá ser informada para especies de Candida.

15. No ha sido establecida la capacidad del panel YeastOne® para testar Posaconazol frente a Cryptococcus.

16. Para informar resultados con productos Sensititre autorizados por la directiva CE IVD y la FDA sólo se deben utilizar instrumentos soportados por Sensititre, es decir, un visor de espejo sencillo, Sensitouch, Vizion, Sensititre Autoreader, Optiread y ARIS; ningún otro sistema será soportado.

RENDIMIENTO

Los paneles están diseñados para ofrecer un rendimiento comparable al procedimiento de microcultivo de referencia CLSI. El rendimiento comparable se define como $\geq 90\%$ de conformidad con una dilución doble de la CIM de referencia (1).

Para obtener más información, póngase en contacto con TREK Diagnostic Systems o con su distribuidor local.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. M27 Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087.
- (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 National Committee for Clinical Laboratory Standards 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., Holiday, 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, posaconazole 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) Holiday, 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 CLSI M38-A , Sensititre_YeastOne® and the Etest. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 1126 - 112

- (19) Espinel-Infgriff, 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, pero puede ser modificada sin previo aviso.

La información más actualizada puede obtenerse en de www.trekds.com\Techinfo o contactando con los servicios técnicos de TREK.



Producido por TREK Diagnostic Systems
Units 17-19 Birches Industrial Estate, East Grinstead,
West Sussex, RH19 1XZ, UK
Tel.: +44-1342-318777

Distribuido por TREK Diagnostic Systems,
982 Keynote Circle, Suite 6, Cleveland, Ohio 44131
Technical Service USA: 1 (800) 642-7029



029-Yeast-ROW-IVD-E-V2.0
Date Updated: 06 August 2012

SENSITITRE®
YEASTONE®

Solo per Uso Diagnostico *in vitro*

Per informazioni complete sulle piastre, quali il formato, i dati di controllo qualità, visitare il sito Web www.trekds.com/techinfo. Nel sito verranno richiesti il codice e il numero di lotto di ciascuna piastra.

USO PREVISTO

Il sistema di sensibilità Sensititre® è un prodotto diagnostico *in vitro* per testare la sensibilità di lieviti non esigenti, tra cui specie di *Candida*, specie di *Cryptococcus*, specie di *Aspergillus* e altre varie specie di lieviti a crescita rapida.

Si tratta del metodo della microdiluizione in brodo su piastra che consente di ottenere risultati qualitativi e quantitativi relativi alla minima concentrazione inibente (MIC). Il brodo di coltura prodotto da TREK Diagnostic Systems è stato convalidato solo con i prodotti Sensititre®.

PRINCIPI DI IMPIEGO

Il test di sensibilità Sensititre® ai lieviti è un test di microdiluizione colorimetrica. Ciascuna piastra viene dosata con agenti antifungini a diluizioni appropriate e con un indicatore colorimetrico.

I risultati vengono letti manualmente osservando la concentrazione di antifungino più bassa che mostra una inibizione della crescita (come evidenziato dall'assenza di cambiamento del colore).

PRECAUZIONI

I risultati dovrebbero rappresentare un valido aiuto nella scelta del farmaco appropriato per la terapia.

Il sistema dovrebbe essere utilizzato solo da personale adeguatamente addestrato alle tecniche dell'antibiogramma.

Visto che con questo prodotto si testano microrganismi viventi, che potrebbero rappresentare fonte di infezione per l'utilizzatore, si consiglia di fare uso di metodi di trattamento e di eliminazione adeguati.

CONSERVAZIONE E SCADENZA

Conservare le piastre a temperatura ambiente (15-25°C) al riparo dalla luce diretta del sole e dal calore. Ogni piastra è imballata in fogli di alluminio con all'interno un essiccante a base di gel di silice. Non utilizzare le piastre o il brodo dopo la data di scadenza o se il desiccante non è di colore blu o arancione o se la confezione è danneggiata.

Inoculare il pannello entro 5 ore da quando è stato rimosso dall'imballaggio.

PROCEDURA

Materiali forniti:

Piastra di sensibilità YeastOne®

Pellicola adesiva

Materiali non inclusi (TREK Inc Codice prodotto)

Acqua demineralizzata Sensititre® [T3339]

Brodo di inoculo YeastOne® [Y3462]

Tappi dosatori Sensititre® (da utilizzare con AutoInoculator®/ AIM®)

Sensititre AutoInoculator® [V3010] /Sensititre AIM® [V3020]

Sensititre Vizion® [V2021]

Sensititre Nephelometer® [V3011]

Specchio per lettura manuale [V4007]

Standard di torbidità 0.5 McFarland [E1041]

Ansa batteriologica

Pipetta da 20µl

Contenitore sterile per l'inoculo

Pipetta da 100ul e puntali monouso

Ceppi di controllo qualità

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

Incubatore a 34-36°C, non-CO₂

Vortex

Documentazione CLSI aggiornata

Solo per *Aspergillus* spp

Takashio o potato dextrose agar

Tamponi

Soluzione salina sterile con 0.05% di Tween 20

Spettrofotometro

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni devono essere raccolti, trasportati, conservati e quindi seminati su un terreno di coltura di isolamento primario per ottenere colonie isolate, come da procedure standard (1).

SELEZIONE DEL BRODO PER L'ANTIBIOGRAMMA

I brodi approvati per Sensititre® sono testati per essere utilizzati con le relative piastre per l'antibiogramma.

PROCEDURA DI INOCULO (Candida and Cryptococcus spp.)

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

Si consiglia una densità finale degli organismi di circa $1,5 - 8 \times 10^3$ CFU/ml.

1. Prelevare alcune colonie di lievito ben isolate di diametro maggiore di 1mm da una coltura pura di 24 ore e sospenderle in acqua sterile. Mescolare con il Vortex la sospensione per 15 secondi, accertandosi che sia uniforme. In caso di agglutinazione, lasciar stabilizzare prima di regolare la densità. Aggiustare a uno standard 0.5 McFarland visivamente o utilizzando un nefelometro Sensititre®

2. Trasferire 20 µl della sospensione in 11 ml di brodo di inoculo YeastOne® per ottenere un inoculo finale di $1,5 - 8 \times 10^3$ CFU/ml.

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

3. Trasferire 100 μ l tramite:

a. **Sensititre® Autolnoculator®/Sensititre® AIM®.** Sostituire il tappo della provetta con una tappo dosatore Sensititre monouso e inoculare la piastra secondo le istruzioni dell'Autolnoculator®/AIM®.

Rimuovere il gruppo provetta/tappo dosatore dall'Autolnoculator® /AIM® entro 30 secondi dal dosaggio di un pannello 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.

Inoculare il brodo nella piastra entro 15 minuti.

4. Per effettuare un controllo del conteggio della coltura, rimuovere 10 μ l dal pozzetto di controllo positivo e seminare su Sabouraud dextrose agar (SDA). Se l'inoculo è corretto si otterranno 10-80 colonie.

5. Coprire tutti i pozzetti con la pellicola adesiva. Evitare la formazione di pieghe che potrebbero lasciar scoperti alcuni pozzetti.

PROCEDURE DI INOCULO (*Aspergillus* spp.) (5-7, 22)

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

1. Fare una subcultura da Sabourad dextrose agar in Takashio o patato dextrose agar . Incubare per 7 giorni a 35°C per ottenere una sporulazione adeguata.

2. Raccogliere i conidi con un tampone e sospenderli in Soluzione Salina con il Tween.

3. Lasciar sedimentare le particelle pesanti per 3-5 minuti.

4. Raccogliere il soprannatante e agitarlo con il vortex

5. Aggiustare la torbidità del soprannatante a 80-82% di transmittanza misurata a 530 nm con uno spettrofotometro equivalente ad un inoculo di $0.6-5 \times 10^6$ cfu/ml. Oppure regolare a una torbidità equivalente allo standard 0,5 McFarland (22).

6. Trasferire 100 μ l in 11ml of brodo di inoculo YeastOne® per ottenere un inoculo finale di $0.5-5 \times 10^4$ cfu/ml

7. Trasferire 100 μ l tramite:

a. **Sensititre® Autolnoculator®/Sensititre® AIM®.** Sostituire il tappo della provetta con una tappo dosatore Sensititre® monouso e inoculare la piastra secondo le istruzioni dell'Autolnoculator®/AIM®.

Rimuovere il gruppo provetta/tappo dosatore dall'Autolnoculator® /AIM® entro 30 secondi dal dosaggio di un pannello 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.

Inoculare il brodo nella piastra entro 15 minuti.

8. Per effettuare un controllo del conteggio della coltura, rimuovere 10 μ l dal pozzetto di controllo positivo e seminare su Sabouraud dextrose agar (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 per almeno 24-25 ore a 35°C in un incubatore non-CO₂.

Le specie di *Cryptococcus* devono essere incubate per 72 ore.

Aspergillus species deve essere incubato da 48 a 72 ore

L'incubazione a temperature superiori a 35°C può incidere sulle performance di queste piastre.

Si possono impilare fino a tre piastre se l'incubazione non avviene in ARIS®

LETTURA DEI RISULTATI

Le piastre possono essere lette visivamente in normali circostanze di illuminazione in laboratorio utilizzando un visualizzatore manuale a specchio o con l'impiego del sistema Sensititre Vizion®. Per maggiori informazioni, fare riferimento al manuale d'uso di Vizion. La crescita dei lieviti nelle soluzioni antifungine si evidenzierà con il cambiamento dell'indicatore colorimetrico di crescita da blu (negativo) a rosso (positivo). Con alcuni 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 (vedere i dettagli di seguito).

1. Esaminare il pozzetto di controllo positivo dopo 24 ore di incubazione (*Candida* sp). Se il controllo positivo è rosso, è possibile leggere gli endpoint degli antifungini. Se il pozzetto è ancora blu o leggermente violaceo, incubare nuovamente per altre 24 ore e riesaminare.

NON LEGGERE LA TORBIDITA' NELLE PIASTRE SENSITITRE YEASTONE®:

Leggere solo i cambiamenti di colore

2. La MIC è la più bassa concentrazione di un agente antifungino che inibisce la crescita dell'organismo evidenziata da un cambiamento di colore. La quantità di cambiamento di colore nei pozzetti contenenti l'agente antifungino dovrebbe essere confrontata con il colore dei pozzetti di controllo positivo.

3. Quando non vi è alcun cambiamento di colore dell'indicatore blu in alcuna diluizione di un antifungino non vi è crescita. L'organismo è sensibile alla più bassa concentrazione di antifungino.

4. La MIC è considerata come la più bassa concentrazione di agente antifungino che previene lo sviluppo di un pozzetto di crescita rosso o viola e corrisponde al primo pozzetto blu.

5. L'organismo è resistente alla più elevata concentrazione di antifungino quando si nota una crescita in tutti i pozzetti. Il valore della MIC corrispondente è "maggiore della" (>) concentrazione più alta dell'antifungino

6. Per le specie di *Aspergillus* leggere la MIC come la più bassa concentrazione di colore blu.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

TABELLA 2. Illustrazione e interpretazione dei possibili risultati

Concentrazione del pozzetto in µg/ml						R = ROSSO: Positivo, crescita B = BLU: Negativo, assenza di crescita	
	1	2	4	8	16	32	
A.	R	R	R	B	B	B	Schema tipico di crescita; la MIC è pari a 8 µg/ml.
B.	R	R	R	R	R	R	Crescita in tutti i pozzetti; la MIC è >32 µg/ml.
C.	B	B	B	B	B	B	Assenza di crescita in tutti pozzetti; la MIC è \leq 1 µg/ml.
D.	R	R	R	B	R	R	“Salto di un pozzetto”. La MIC è >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”. Il test deve essere ripetuto

¹ Con tecniche accurate questi eventi sono rari

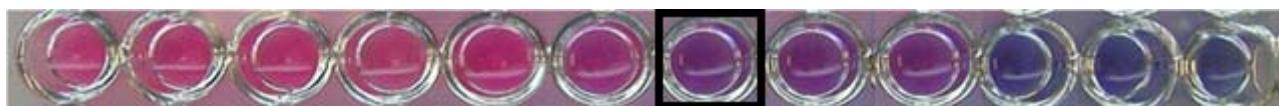
Amfotericina B. Per l'amfotericina B a 24 ore, gli endpoint vengono definiti con facilità e la MIC è letta come la più bassa concentrazione di farmaco che previene ogni distinguibile cambiamento di colore. Di solito non si incontrano endpoint con il fenomeno del trailing per l'amfotericina B.

Il primo pozzetto che mostra un cambiamento di colore definito rispetto al pozzetto di crescita positiva è il MIC.



5-Fluorocitosina e Antifungini Azolici. *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* con la 5-fluorocitosina e gli azoli, quali fluconazolo, itraconazolo, ketoconazolo voriconazolo e posaconazolo possono dare end point meno netti a causa del fenomeno del trailing tali da rappresentare un'importante fonte di variabilità. Il trailing si verifica quando persiste un leggero cambiamento di colore ed è spesso identico per tutte le concentrazioni di farmaco superiori alla MIC. La MIC dovrebbe essere letta come il primo pozzetto che mostra un cambiamento di colore meno intenso rispetto al pozzetto di controllo positivo. Ceppi di riferimento di sensibilità definita possono essere utili per l'addestramento del personale. Si suppone che isolati di *Candida krusei* siano naturalmente 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: ciò si verifica quando persiste un cambiamento di colore leggero ed è spesso identico in varie concentrazioni. Il MIC deve essere letto come il primo pozzetto che mostra un cambiamento di colore meno intenso rispetto al pozzetto di controllo positivo.



Echinocandine. Gli end point della MIC dovranno essere determinati dopo 24 ore di incubazione a 35°C. La lettura della MIC dovrà basarsi sul primo pozzetto che mostra un viraggio di colore meno intenso rispetto al pozzetto di controllo positivo.



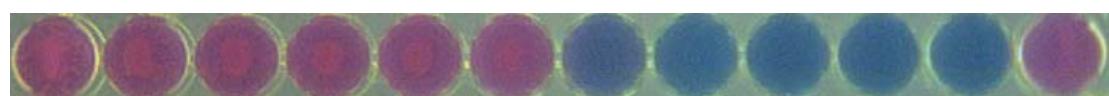
Itraconazole:

L'itraconazole può a volte fuoriuscire dalla soluzione a concentrazioni di ≥ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ciò può risultare in un pozzetto alterato che mostra crescita e diventa rosso.



A volte è stata riscontrata una crescita paradossa delle concentrazioni più elevate di Itraconazole sui pannelli per lieviti Sensititre, che comporta la colorazione di rosa di questi pozzetti.

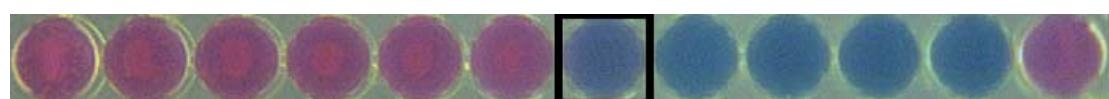
L'effetto paradossale, noto anche come fenomeno di Eagle, fa riferimento ad un'osservazione in cui un aumento della concentrazione antimicrobica oltre un determinato punto comporta, in maniera paradossa, un aumento dei batteri in grado di sopravvivere. Una possibile spiegazione potrebbe essere che poiché la concentrazione è troppo elevata, l'agente potrebbe 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

Soluzione

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



0.008 0.015 0.03 0.06 0.12 0.25 0.5 1 2 4 8 16

In caso di domande o dubbi, rivolgersi alla divisione di assistenza tecnica al numero +441342318777 oppure inviare una e-mail a: techsupport@trekds.co.uk.

In alternativa è possibile contattare il numero +1-800-871-8909 o inviare una e-mail a techsupport@trekds.com negli Stati Uniti.

In alternativa è possibile contattare il numero +1-800-871-8909 o inviare una e-mail a techsupport@trekds.com negli Stati Uniti.

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 le cause.

Un pozzetto blu in una serie di pozzetti rossi di crescita indica un “salto” e deve essere ignorato. Il MIC deve essere letto al di sopra di tutti i pozzetti di salto. Se è stato saltato più di un pozzetto, gli antifungini **non** devono essere riportati.



CONTROLLO DI QUALITÀ

La frequenza dei test di controllo qualità deve essere conforme alle linee di guida locali (1).

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

Tutte le piastre Sensititre® contengono pozzetti di controllo positivo. I test non sono validi se non vi è una netta crescita in tutti i pozzetti di controllo positivo.

Per il controllo di qualità del sistema MIC, si consigliano le seguenti colture dell' American Type Culture Collection (ATCC®):

<i>Candida krusei*</i>	ATCC® 6258
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC® 22019

*ATCC descrive ora questi organismi come *Issatchenkovia orientalis*.

Non refertare, se i risultati QC non sono entro il range.

I valori attesi QC previsti sono forniti in Tabella 3

Nel caso non sia possibile risolvere discrepanze nel controllo di qualità, contattare il distributore Sensititre® o TREK Diagnostic Systems.

TABELLA 3. Valori MIC consigliati a 24 e a 48 ore per ceppi di Controllo di Qualità ($\mu\text{g/ml}$).

I range differenti o aggiunti a quelli pubblicati per i controlli di qualità sono sottolineati(1) .

Agente Antifungino	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258		<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	
	24 ore	48 ore	24 ore	48 ore
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	<u>2 - 8</u>
5 – Fluorocitosina	4 - 16	8 - 32	<u>0.12 - 0.5</u>	0.12 - 0.5
Itraconazolo	0.12 - 1	0.25 - 1	0.12 - 0.5	0.12 - 0.5
Ketoconazolo	0.12 – 1	0.25 - 1	0.03 – 0.25	0.06 - 0.5
Micafungina	<u>0.06 – 0.25</u>	0.12 – 0.5	0.5 – 2	0.5 - 4
Posaconazolo	0.06 - 0.5	0.12-1	0.06 - 0.25	0.06 - 0.25
Voriconazolo	0.06 – 0.5	0.12 - 1	0.015 – 0.12	0.03 - 0.25

TABELLA 4. Criteri di interpretazione MIC ($\mu\text{g/ml}$) per le specie di *Candida* (CLSI M27)

Agente Antifungio	Sensibile	Sensibile Dose Dipendente	Intermedio	Resistente	Non-Sensible
Anidulafungina	<u>< 2</u>				> 2
Caspofungina	<u>< 2</u>				> 2
Fluconazolo*	<u><8</u>	16 - 32		<u>>64</u>	
5-Fluorocitosina	<u><4</u>		8 - 16	<u>>32</u>	
Itraconazolo	<u><0.125</u>	0.25 - 0.5		<u>>1</u>	
Micafungina	<u>< 2</u>				> 2
Voriconazolo	<u><1</u>	2		<u>>4</u>	

* Gli isolati di *Candida krusei* si presumono essere intrinsecamente resistenti al fluconazolo e le loro MIC non devono essere interpretate utilizzando questa scala.

NOTA 1: Si mostrano i breakpoint ($\mu\text{g/mL}$) per la *Candida* spp. Contro gli indicati agenti Se si misurano concentrazioni minime di inibitore (MIC) utilizzando una scala che fornisce risultati che capitano tra categorie, viene implicata la categoria più alta. Pertanto un isolato con una concentrazione minima di fluconazolo sarà collocato nella categoria S-DD.

Per ulteriori informazioni sull'interpretazione dei risultati fare riferimento al CLSI (1).

LIMITAZIONI

1. Le piastre Sensititre YeastOne[®] devono essere testate con lieviti non esigenti tra cui specie di *Candida*, specie di *Cryptococcus*, specie di *Aspergillus* e specie varie di lieviti a crescita rapida. Non devono essere utilizzate per lieviti esigenti o a crescita lenta quali *Histoplasma* o *Blastomyces* e funghi filamentosi.
2. Sono stati effettuati dei confronti tra il metodo YeastOne Sensititre[®] a 24 ore e il metodo di riferimento CLSI a 48 ore. Tuttavia, a causa della difficoltà nel correlare gli end point per le specie caratterizzate dal fenomeno del trailing (*C. albicans*) dopo un'incubazione di 48 ore, si sono osservati notevoli discrepanze.
3. Testare funghi e agenti antifungini è, per loro natura, meno preciso che testare i 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 ceppi. Lo standard ufficiale CLSI indica che le letture devono essere effettuate a 48 ore. Fino alla raccolta e all'analisi di una quantità sufficiente di dati, la questione del migliore tempo di lettura dal punto di vista clinico rimane irrisolta. I referti dovrebbero indicare chiaramente i tempi di lettura.
5. Per maggiori indicazioni, si consiglia di leggere lo Standard delle Sensibilità degli Antifungini CLSI M27.
6. L'end point è rappresentato dal cambiamento di colore, non dalla torbidità (ciò allevia molte preoccupazioni relative all'interpretazione di alcune specie di *Candida* a causa del fenomeno del trailing. Il trailing si verifica di solito con isolati diversi da quelli del sangue e di altri fluidi sterili del corpo).
7. Non effettuare la lettura a 24 ore se il pozzetto di controllo non è diventato completamente positivo.
8. Le performance 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 ai lieviti approvato per Sensititre[®]. L'uso di altri brodi può causare errori.
10. Come per qualsiasi altro test di sensibilità in vitro, i risultati dovrebbero essere correlati con la risposta clinica del paziente alla terapia prescritta.
11. Le performance verso *Aspergillus* sp. sono state stabilite solo per amfotericina B, itraconazolo posaconazolo e voriconazolo.
12. La referenza bibliografica 5 mostra un alto livello d'accordo (>99%) con il metodo CLSI per amfotericina B e *Aspergillus* species. Un livello d'accordo inferiore è presente tra itraconazolo e *A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. terreus* hanno un accordo >90%, mentre *A. nidulans* ha 85% di accordo e *A. ustus* 33% con le piastre incubate per 48 ore con un inoculo pari a 10³ cfu/ml. Accordo superiore a 90% è stato osservato con un inoculo di 10⁴ cfu/ml e un incubazione di 72 ore per itraconazolo e amfotericina B (6).
13. Non è stata ancora stabilita la correlazione tra la MIC della Caspofungina e il trattamento farmacologico con la stessa.
14. Le performance della piastra YeastOne[®] con Anidulafungina, Caspofungina, e Micafungina con le specie di *Cryptococcus*, *Aspergillus* e lieviti a rapida crescita, **ad eccezione delle specie di Candida**, non sono state ancora stabilite. Le MIC per la Anidulafungina, Caspofungina, e Micafungina dovrebbero pertanto essere refertate solo per le specie di *Candida*.
15. Le performance della piastra YeastOne[®] con Posaconazolo con *Cryptococcus* non sono state ancora stabilite.
16. Solo strumenti supportati da Sensititre, quali un semplice visore a specchio, Sensitouch, Vizion, Sensititre Autoreader, Optiread e ARIS devono essere utilizzati per refertare i risultati con prodotti per IVD marcati CE e approvati dalla FDA statunitense. Qualsiasi altro sistema utilizzato non sarà supportato.

PERFORMANCE

I pannelli a lettura manuale o automatica sono progettati per ottenere performance paragonabili alla procedura di riferimento CLSI di microdiluizione in brodo. Le performance paragonabili sono definite come un accordo $\geq 90\%$ ad una doppia diluizione della MIC di riferimento (1).

Per maggiori informazioni, contattare TREK Diagnostic systems o il rivenditore locale

BIBLIOGRAFIA

- (1) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. M27 Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087.
- (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., Holiday, 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., *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, posaconazole 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 CLSI M27-A2 multicenter study . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 1604 -1607
- (17) Holiday, 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-Infgrroff, 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

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

Le ultime informazioni possono essere scaricate da www.trekds.com\techinfo o contattando il servizio.



Prodotto da TREK Diagnostic Systems
Units 17-19 Birches Industrial Estate, East Grinstead,
West Sussex, RH19 1XZ, UK
Tel: +44-1342-318777

Distribuito da TREK Diagnostic Systems
982 Keynote Circle, Suite 6, Cleveland, Ohio 44131
Technical Service USA: 1 (800) 642-7029



029-Yeast-ROW-IVD-I-V2.0
Date Updated: 06 August 2012



**SENSITITRE®
YEASTONE®**

Nur für in vitro Gebrauch

Umfassende Informationen über die Plattenkultur, einschließlich Platten-Layout, Informationen zur Qualitätskontrolle, finden Sie auf www.trekds.com/techinfo. Platten-Code und Chargennummer werden benötigt.

VERWENDUNGSZWECK

Das Sensititre® Empfindlichkeitssystem ist ein Produkt für die *in-vitro-Diagnose* für Empfindlichkeitstests von anspruchslosen Hefen einschließlich *Candida*-Spezies, *Cryptococcus*-Spezies, *Aspergillus*-Spezies und sonstigen schnell wachsenden Hefespezies.

Es stellt eine Mikro-Bouillon-Methode dar, die qualitative Ergebnisse sowie quantitative Minimum Inhibitory Concentration (MIC) –Ergebnisse in einem Trockenplatten-Format liefert. Die von TREK Diagnostic Systems hergestellte Nährlösung wurde nur mit Sensititre®-Produkten validiert.

ANWENDUNGSGRUNDÄTZE

Der Sensititre® Hefeempfindlichkeitstest ist ein kolorimetrischer Mikroverdünnungstest. Jede Platte wird mit fungiziden Mitteln in den entsprechenden Verdünnungen dosiert und enthält eine kolorimetrische Anzeige.

Die Ergebnisse werden manuell abgelesen, indem die niedrigste fungizide Konzentration beobachtet wird, bei der ein Wachstum verhindert wird (dies wird durch eine ausbleibende Farbänderung angedeutet).

VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Ergebnisse sollten als Hilfe bei der Auswahl des Behandlungsmedikaments der Wahl verwendet werden.

Das System darf nur von Personal verwendet werden, das in Techniken zur Empfindlichkeitsprüfung geschult worden ist.

Da lebende Mikroorganismen, die mit diesem Produkt verwendet werden, für den Benutzer infektiös sein können, sollten geeignete Handhabungs- und Entsorgungspraktiken angewendet werden.

LAGERUNG UND LEBENSDAUER

Die Platten sollten bei Raumtemperatur (15-25°C) gelagert und vor direkter Sonneneinstrahlung und direkter Hitzeeinwirkung geschützt werden. Jede Platte ist zusammen mit einem Kieselgel-Trocknungsmittel in Folie verpackt. Verwenden Sie Platten und Nährlösungen nicht, wenn das Verfalldatum abgelaufen, das Trockenmittel nicht blau oder orange oder die Folienverpackung defekt ist.

Platte innerhalb 5 Stunden nach öffnen der Folienverpackung inkulieren.

VERFAHREN

Im Lieferumfang enthaltene Materialien:

YeastOne® Empfindlichkeitsplatte

Selbstklebender Verschluss

Materialien, die erforderlich, aber nicht mitgeliefert sind [TREK Inc Produktkode]:

Sensititre® demineralisiertes Wasser [T3339]

Sensititre® Inokulumbouillon für die Hefeempfindlichkeit [Y3462]

Sensititre® Dosierköpfe (zur Verwendung mit AutoInoculator®/AIM®) [E3010]

Sensititre AutoInoculator® [V3010] / Sensititre AIM® [V3020]

Sensititre Vizion® [V2021]

Sensititre® Nephelometer® [V3011]

Manuelles Betrachtungsgerät [V4007]

0.5 McFarland-Trübungsstandard [E1041]

Bakteriologischer Loop (Öse)

20µl -Pipette

Steriler Inokulumbehälter

100ul-Pipette und Einwegspitzen

Qualitätskontrollstämme

Agarplatten mit Pilzwachstumsmedium, z.B. Sabouraud Dextrose-Agar (SDA)

Inkubator 34-36°C, Nicht-CO₂

Vortex-Mixer

Gegenwärtige CLSI -Dokumente

Nur *Aspergillus* spp

Takashio oder Kartoffel Dextrose Agar

Baumwolle Tupfer

Sterile Kochsalzlösung mit 0.05% Tween 20

Spectrophotometer

PRÄPARATSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

Präparate sollten gesammelt, transportiert, gelagert und danach auf das primäre Isolationsmedium gegeben werden, um isolierte Kolonien mithilfe von Standardverfahren zu erzeugen (1).

AUSWAHL DER NÄHRLÖSUNG FÜR DEN EMPFINDLICHKEITSTEST

Von Sensititre® zugelassene Nährlösungen werden Leistungstest mit Sensititre®-Produkten zur Empfindlichkeitsprüfung unterzogen.

INOKULATIONSVERFAHREN (*Candida* und *Cryptococcus* Spp.)

Alle Nährlösungen vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

Es wird eine endgültige Organismusdichte von ca. 1,5 - 8 X 10³ KBE/ml empfohlen.

1. Mehrere gut isolierte Kolonien mit einem Durchmesser >1mm aus einer reinen 24-Stunden-Kultur des Hefisolats entnehmen und in sterilisiertem Wasser emulgieren. Die Suspension 15 Sekunden lang mithilfe des Vortex-Mixers mischen, bis sichergestellt ist, dass die Suspension gleichmäßig durchmischt ist. Falls Klumpen auftreten, müssen diese Klumpen sich am Boden absetzen, bevor die Dichte angepasst wird. Die Suspension visuell an einen 0.5 McFarland-Standard anpassen oder einen Sensititre® Nephelometer® zu diesem Zweck verwenden.

2. 20 µl Suspension in 11 ml YeastOne Inokulumbouillon übertragen. Damit ergibt sich ein Inokulum von 1,5 - 8 X 10³ KBE/ml.

Die Schritte 1 und 2 sollten innerhalb von 15 Minuten abgeschlossen sein.

3. 100µl übertragen. Hierzu stehen zwei Methoden zur Auswahl:

a. **Sensititre Autolnocolator®/ Sensititre AIM®.** Die Verschlusskappe des Röhrchens durch einen Sensititre® Einwegdosierkopf ersetzen und die Platte gemäß den Autolnocolator®/ AIM® -Anweisungen inokulieren.

Die Dosierkopf-Teströhrchen-Kombination innerhalb von 30 Sekunden nach der Dosierung einer Platte aus dem Autolnocolator® /AIM® nehmen und umgekehrt in einem Gestell aufbewahren oder entsorgen.

b. **Manuelle Pipette.** Die Bouillon in einen sterilen Keimtrug geben und die Platte mithilfe einer entsprechenden Pipette inokulieren.

Die Bouillon innerhalb von 15 Minuten in eine Platte inokulieren.

4. Die Koloniezählung sollte überprüft werden, indem 10µl aus dem positiven Kontroll-Well entfernt und auf den Sabouraud Dextrose-Agar (SDA) gegeben werden. Ein korrektes Inokulum produziert 10-80 Kolonien.

5. Alle Wells mit der selbstklebenden Folie versiegeln. Es muss darauf geachtet werden, dass keine Falten entstehen, da diese zu Sprüngen führen könnten.

INOKULATIONSVERFAHREN (*Aspergillus* spp.) (5-7, 22)

Alle Nährösungen vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

1. Kolonien von Sabouraud Dextrose Ager entnehmen und auf Tasashio oder Kartoffel Dextrose Agar impfen. Kultur 7 Tage bei 35°C inkubieren.

2. Konidien mit einem sterilen Baumwolle Tupfer entnehmen und in steriler Kochsalzlösung mit Tween auflösen.

3. Inokulum 3-5 Minuten stehen lassen bis Partikel sedimentiert sind

4. Überstand entnehmen und auf einem Vortexmixer gut mischen.

5. Trübung mit einem Spektrophotometer bei 530-nm auf 80 bis 82% Durchgang einstellen. Dies entspricht ein Inokulum von 0.6 – 5 x 10⁶ KBE/ml. Oder alternativ auf einen McFarland-Standard von 0.5 einstellen (22).

6. 100µl dieser Lösung zu 11ml YeastOne® Bouillon geben und gut mischen (inokulumdichte 0.5-5 x 10⁴ KBE/ml).

7. 100µl übertragen. Hierzu stehen zwei Methoden zur Auswahl:

a. **Sensititre Autolnocolator®/ Sensititre AIM®.** Die Verschlusskappe des Röhrchens durch einen Sensititre® Einwegdosierkopf ersetzen und die Platte gemäß den Autolnocolator®/ AIM® -Anweisungen inokulieren.

Die Dosierkopf-Teströhrchen-Kombination innerhalb von 30 Sekunden nach der Dosierung einer Platte aus dem Autolnocolator® /AIM® nehmen und umgekehrt in einem Gestell aufbewahren oder entsorgen.

b. **Manuelle Pipette.** Die Bouillon in einen sterilen Keimtrug geben und die Platte mithilfe einer entsprechenden Pipette inokulieren.

Die Bouillon innerhalb von 15 Minuten in eine Platte inokulieren.

8. Die Koloniezählung sollte überprüft werden, indem 10µl aus dem positiven Kontroll-Well entfernt und auf den Sabouraud Dextrose-Agar (SDA) gegeben werden. Ein korrektes Inokulum produziert 50-500 Kolonien.

9. Alle Wells mit der selbstklebenden Folie versiegeln. Es muss darauf geachtet werden, dass keine Falten entstehen, da diese zu Sprüngen führen könnten.

INKUBATION

Die Platten über einen Zeitraum von 24-25 Stunden bei 35°C in einem Nicht-CO₂-Inkubator minimal inkubieren.

Cryptococcus-Spezies sollten 72 Stunden lang inkubiert werden.

Aspergillus-Spezies 48 bis 72 Stunden inkubieren.

Eine Inkubation bei Temperaturen über 35°C könnte die Leistung dieser Platten beeinflussen.

Falls die Platten nicht im ARIS® inkubiert werden, können bis zu drei Platten zugleich gestapelt werden.

ABLESUNG DER TESTERGEBNISSE

Die Platten können bei normaler Laborbeleuchtung mit einem manuellen Spiegelbetrachter oder mit Hilfe des Sensititre Vizion®-Systems betrachtet werden. Siehe das Vizion Anwenderhandbuch mit weiteren Informationen. Hefewachstum in den fungiziden Lösungen macht sich als eine Änderung der kolorimetrischen Wachstumsanzeige von blau (negativ) auf rot (positiv) bemerkbar. Es kann sein, dass einige Hefen die Anzeige nicht vollständig auf rot verändern, sondern eine eher purpurfarbene Anzeige hervorrufen. Eine Organismen können eine leichte purpurfarbene Veränderung in Posaconazol, Voriconazol, Fluconazol, Itraconazol und Ketoconazol hervorrufen. (Siehe Details zum Ableseverfahren weiter unten.)

1. Das Well mit dem positiven Wachstum muss nach einer Inkubation von 24 Stunden untersucht werden (*Candida* spp). Falls die Wachstumskontrolle eine rote Farbe aufweist, können die Endpunkte für die Antimykotika interpretiert werden. Falls das Well immer noch blau oder leicht purpurfarben ist, muss die Lösung weitere 24 Stunden lang inkubiert und anschließend erneut ausgewertet werden.

DIE TRÜBUNG IN DEN SENSITITRE YEASTONE® PLATTEN NICHT ABLESEN.
Nur die Farbveränderung darf gelesen werden.

2. Der MIC ist als die niedrigste Konzentration eines Antimykotikums definiert, bei der das Wachstum eines Organismus bedeutend gehindert wird. Dies wird durch eine Farbänderung nachgewiesen. Der Betrag der Farbänderung in den Wells, die das Mittel enthalten, muss mit der Farbe der Wells für die positive Wachstumskontrolle verglichen werden.

3. Wenn die blaue Anzeige in der Lösung eines fungiziden Mittels keine Veränderung aufweist, hat kein Wachstum stattgefunden. Der Organismus reagiert empfindlich auf die niedrigste Fungizidkonzentration.

4. Der MIC wird als die niedrigste Konzentration von fungizidem Mittel notiert, bei dem die Entwicklung eines roten oder purpurfarbenen Wachstums in einem Well verhindert wird, d.h. erstes blaues Well.

5. Der Organismus ist gegen die höchste Fungizidkonzentration resistent, falls in allen Wells Wachstum beobachtet wird. Der MIC-Endpunkt sollte als diejenige Stelle aufgezeichnet werden, die „größer als“ (>) die höchste Konzentration ist.

6. Aspergillus-Spezies: der MHK-Wert ist die niedrigste Konzentration mit einer blauen Farbe.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

TABELLE 2. Schilderung und Interpretation von möglichen Testergebnissen

Well-Konzentration µg/ml							R =ROT: Positive Wachstumsanzeige B=BLAU:Negative Wachstumsanzeige
	1	2	4	8	16	32	
A.	R	R	R	B	B	B	Typisches Wachstumsmuster; der MIC-Endpunkt ist 8 µg/ml.
B.	R	R	R	R	R	R	Wachstum in allen Wells; der MIC-Endpunkt ist >32 µg/ml.
C.	B	B	B	B	B	B	Keines der Wells weist Wachstum auf; der MIC-Endpunkt ist <1 µg/ml.
D.	R	R	R	B	R	R	„Übersprungenes Well“. Der MIC-Endpunkt ist >32 µg/ml. Der „Sprung“ sollte verworfen werden, falls die Wells zu beiden Seiten Wachstum aufweisen. Falls in einer Spalte nicht nur einer, sondern mehrere „Sprünge“ auftreten, sind die Testergebnisse ungültig ¹ .
E.	R	R	B	B	R	R	Doppeltes „übersprungenes Well“. Der Test sollte wiederholt werden ¹ .

¹ Diese Ereignisse sollten bei sorgfältiger Anwendung der Testtechnik nur sehr selten eintreten.

ABLESEHINWEISE

Amphotericin B. Für amphotericin B nach einer Zeitdauer von 24 Stunden sind die Endpunkte typischerweise einfach zu definieren und der MIC wird als die niedrigste Medikamentenkonzentration abgelesen, die jegliche wahrnehmbare Farbänderung verhindert. Verschleppte Endpunkte kommen mit amphotericin B gewöhnlich nicht vor.

Das erste Well, das eine deutliche Farbänderung im Vergleich zu dem Well mit dem positiven Wachstum zeigt, ist der MIC.



Flucytosin- und Azol-Fungizide. *Candida albicans*, *C. glabrata* und *C. tropicalis* mit flucytosin und Azolen, wie beispielsweise fluconazol, itraconazol, ketoconazol, voriconazol und Posaconazol können zu Endpunkten führen, die typischerweise aufgrund von schleppendem Wachstum weniger scharf definiert sind. Dies kann eine bedeutende Quelle für Variationen darstellen. Schleppen entstehen, wenn eine leichte Farbänderung bestehen bleibt. Schleppen sind oftmals für alle Medikamentenkonzentrationen oberhalb des MIC identisch. Der MIC sollte als erstes Well abgelesen werden, das eine weniger intensive Farbänderung im Vergleich zum positiven Kontroll-Well aufweist. Referenzstämme mit definierter Empfindlichkeit können ebenfalls dabei helfen, das Personal in diesen Fällen zu schulen. Es wird angenommen, dass die Isolate von

Candida krusei intrinsisch gegen fluconazol resistent sind. Aus diesem Grund sollten die MICs nicht interpretiert werden (1) und die berichteten Testergebnisse sollten einen begleitenden Kommentar enthalten.

Verschleppter Endpunkt: Dies tritt auf, wenn eine leichte Farbänderung persistiert, und ist häufig bei verschiedenen Konzentrationen identisch. Der MIC sollte als das erste Well abgelesen werden, das eine weniger intensive Farbänderung im Vergleich zu dem Kontroll-Well mit dem positiven Wachstum zeigt.



Echinocandine. Die MHK-Endpunkte sollen nach Inkubation bei 35°C nach 24 Stunden bestimmt werden. Als MHK-Wert soll das erste Well abgelesen werden, das eine weniger ausgeprägte Farbveränderung zeigt als das Well mit der Positivkontrolle.



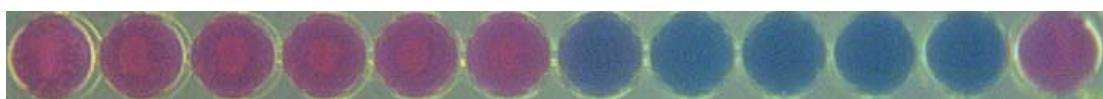
Itraconazol:

Itraconazol kann gelegentlich bei Konzentrationen von $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ aus der Lösung austreten. Dies kann dazu führen, dass das betroffene Well Wachstum zeigt und sich rot färbt.



Von Zeit zu Zeit beobachten wir paradoxes Wachstum bei den höheren Itraconazol-Konzentrationen auf den Sensititre Heferesistenz-Platten, was zu einer Rosafärbung dieser Wells führt.

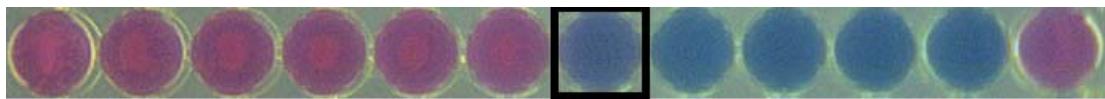
Die paradoxe Wirkung wird auch als Eagle-Effekt bezeichnet. Er bezieht sich auf eine Beobachtung, bei der ein Zuwachs der antimikrobiellen Konzentration über einen bestimmten Wert paradoxerweise zu einer Erhöhung der Anzahl Bakterien führt, die überleben. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass der Wirkstoff, da die Konzentration zu hoch ist, den Rezeptor, mit dem er sich verbindet, selbst antagonisiert (zum Beispiel Penizillin, das Proteine bindet, im Fall eines Penizillins).



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

Lösung

Das Wachstum bei der hohen Konzentration sollte ignoriert werden, es sei denn, Sie beobachten ebenfalls ein Wachstum bei allen anderen Konzentrationen von Itraconazol. Bei dem unten dargestellten Beispiel ist der 0,5 $\mu\text{g/ml}$ -Well durch den schwarzen Kasten hervorgehoben. Dort sollte das MIC-Ergebnis abgelesen werden.



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

Wenn Sie weitere Fragen oder Bedenken haben, zögern Sie bitte nicht, sich an unsere technische Kundendienstabteilung unter der Telefonnummer +441342318777 oder per E-Mail an techsupport@trekds.co.uk zu wenden.

Alternativ rufen Sie in den USA bitte unter der Telefonnummer +1-800-871-8909 an oder schicken eine E-Mail an techsupport@trekds.com.

Kontaminierung/Sprünge

Alternativ könnte ein rosafarbenes (Wachstums-) Well zwischen blauen Wells (ohne Wachstum) auf eine Kontaminierung hinweisen. Züchten Sie den Inhalt des Wells in einer Subkultur, um die Ursache festzustellen.

Ein blaues Well in einer Reihe von roten Wachstums-Wells weist auf einen „Sprung“ hin und muss ignoriert werden. Der MIC sollte oberhalb aller übersprungenen Wells abgelesen werden. Wenn mehr als ein übersprungenes Well vorliegt, darf das Fungizid **nicht** berichtet werden.



QUALITÄTSKONTROLLE

Die Häufigkeit, mit der die Qualitätskontrollen durchgeführt werden, sollten sich nach den lokalen Richtlinien orientieren (1).

Das Inokulum sollte auf ein geeignetes Kulturmedium gegeben werden, um Verunreinigungen zu überprüfen. Falls eine Mischkultur erkannt wird, sind die Testergebnisse ungültig.

Alle Sensititre® Platten enthalten positive Kontroll-Wells. Die Tests sind ungültig, solange kein klar erkennbares Wachstum in allen positiven Kontroll-Wells festgestellt worden ist. Zum Zweck der Qualitätskontrolle des MIC-Systems durch den Benutzer werden die folgenden Kulturen aus der American Type Culture Collection (ATCC®) empfohlen:

<i>Candida krusei</i> *	ATCC® 6258
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC® 22019

*ATCC führt diese Organismen jetzt unter der Bezeichnung *Issatchenkia orientalis*.

Falls die Ergebnisse der Qualitätskontrolle außerhalb des Bereichs liegen, dürfen die Ergebnisse **nicht** berichtet werden.

Erwartete Qualitätskontrollwerte können in Tabelle 3 gefunden werden.

Falls die Diskrepanzen bezüglich der Qualitätskontrolle nicht zufriedenstellend gelöst werden können, wenden Sie sich bitte an Ihren Sensititre® Händler oder an TREK Diagnostic Systems.

TABELLE 3. Empfohlene 24-Std.- und 48-Std.-MIC-Bereiche für Qualitätskontrollstämme (µg/ml).

Bereiche die unterschiedlich oder ergänzend zu veröffentlichten QC- Bereiche sind, sind unterstrichen. (1).

Fungizides Mittel	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258		<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	
	24 Stunden	48 Stunden	24 Stunden	48 Stunden
Posaconazol	0.06 - 0.5	0.12-1	0.06 - 0.25	0.06 - 0.25
Anidulafungin	0.03 - 0.12	-	0.25 - 2	-
Caspofungin	0.12 - 1	0.25 - 1	0.25 - 1	0.5 - 4
Amphotericin B	0.5 - 2	1-4	0.25 - 2	0.5 - 4
Fluconazol	8 - 64	16 - 128	0.5-4	<u>2 - 8</u>
Itraconazol	0.12 - 1	0.25 - 1	0.12 - 0.5	0.12 - 0.5
Ketoconazol	0.12 - 1	0.25 - 1	0.03 - 0.25	0.06 - 0.5
Micafungin	<u>0.06 - 0.25</u>	0.12 - 0.5	0.5 - 2	0.5 - 4
5 - Flucytosin	4 - 16	8 - 32	<u>0.12 - 0.5</u>	0.12 - 0.5
Voriconazol	0.06 - 0.5	0.12 - 1	0.015 - 0.12	0.03 - 0.25

TABELLE 4. MIC-Interpretationskriterien (µg/ml) für *Candida*-Species (CLSI M27)

Fungizides Mittel	Empfindlich	Empfindlich in Abhängigkeit von der Dosis	Zwischen empfindlich und resistant	Resistent	Resistent
Anidulafungin	<u>< 2</u>				> 2
Caspofungin	<u>< 2</u>				> 2
Fluconazol*	<u>≤ 8</u>	16 - 32	<u>≥ 64</u>		
Itraconazol	<u>≤ 0.125</u>	0.25 - 0.5	<u>≥ 1</u>		
Micafungin	<u>< 2</u>				> 2
Flucytosin	<u>≤ 4</u>		8 - 16	<u>≥ 32</u>	
Voriconazol	<u>≤ 1</u>	2		<u>≥ 4</u>	

Es wird angenommen, dass Isolate von *Candida krusei* gegen Fluconazol intrinsisch resistent sind, und ihre MHK dürfen nicht mit Hilfe dieser Skala interpretiert werden.

HINWEIS 1: Es sind die Messpunkte (Breakpoints in ug/mL) für *Candida* spp. gegen die angegebenen Wirkstoffe genannt. Wenn die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) mit Hilfe einer Skala gemessen werden, bei der die Ergebnisse zwischen die Kategorien fallen können, wird die nächsthöhere Kategorie angenommen. Daher würde ein Isolat mit einem Fluconazol-MHK von 12,5 ug/mL in die Kategorie S-DD (empfindlich –dosisabhängig) fallen.

Weitere Informationen über die Beurteilung der Ergebnisse finden Sie in den CLSI-Dokumenten (1).

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Sensititre YeastOne® Platten sind für den Gebrauch mit anspruchslosen Hefen, einschließlich *Candida*-Species, *Cryptococcus*-Species und sonstigen schnell wachsenden Hefespezies, vorgesehen. Sie sind nicht für anspruchsvolle oder langsam wachsende Hefen wie *Histoplasma* oder *Blastomyces* sowie filamentäre Pilze geeignet.
2. Es wurde ein Vergleichstest zwischen Sensititre YeastOne® nach 24 Stunden und der CLSI (NCCLS)-Referenzmethode nach 48 Stunden durchgeführt und ausgewertet. Aufgrund der Schwierigkeit, die Endpunkte schleppender Organismen (*C. albicans*) nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden zu korrelieren, wurden jedoch hohe Fehlerraten beobachtet.
3. Tests von Pilzen und Fungiziden sind von Natur aus weniger präzise als Tests von Bakterien.
4. Aufgrund des Problems mit Schleppen bei bestimmten Isolaten sind einige Forscher der Meinung, dass die 24-Stunden-Ablesung besser geeignet ist als die 48-Stunden-Ablesung. Der offizielle CLSI -Standard deutet an, dass Ablesungen nach 48 Stunden durchgeführt werden sollten. Solange keine genügende Datenmenge gesammelt und ausgewertet worden ist, wird die Frage nach dem klinisch relevantesten Zeitpunkt der Ablesung weiterhin unbeantwortet bleiben. Die Zeit der Ablesung muss aus der Berichterstattung der Ergebnisse klar hervorgehen.
5. Um weitere Richtlinien und Informationen zu erhalten, wird die Lektüre des CLSI Antifungal Susceptibilities Standard M27 (Fungizidempfindlichkeits-Standard) empfohlen.
6. Eine Farbänderung – und nicht die Trübung - ist die Anzeige für den Endpunkt. (Diese Tatsache schafft Klarheit hinsichtlich einiger größerer Bedenken in Bezug auf die Interpretation bestimmter *Candida*-Spezies aufgrund von „Schleppen“. Schleppen werden häufiger bei Isolaten beobachtet, die nicht aus Blut und anderen sterilen Körperflüssigkeiten stammen.)
7. Falls das Kontroll-Well nicht vollständig auf positiv umgeschlagen ist, dürfen die Ergebnisse nach 24 Stunden nicht abgelesen werden.
8. Die Wirksamkeit von Voriconazol mit *Cryptococcus*-Spezies und schnell wachsenden Hefespezies wurde nicht bestimmt. Die MICs für Voriconazol sollten deshalb nur für die *Candida*-Spezies berichtet werden.
9. Nur mit Sensititre®- zugelassenem Inokulumbouillon für Hefeempfindlichkeit verwenden. Die Verwendung anderer Bouillons könnte zu Fehlern führen.
10. Wie bei jeder anderen in-vitro-Testmethode für Empfindlichkeit sollten die Ergebnisse der Tests mit der klinischen Reaktion des Patienten auf die verordnete Therapie korreliert werden.
11. Ergebnisse wurden für amphotericin B, Itraconazol Posaconazol und Voriconazol wurden nur für *Aspergillus*-Spezies ermittelt.
12. Referenz 5 ergab eine gute Übereinstimmung (>99% agreement) mit der CLSI (NCCLS) Methode für amphotericin B und *Aspergillus*-Spezies. Itraconazol, *A. fumigatus* ergab eine niedrigere Übereinstimmung, *A. flavus* und *A. terreus* ergaben eine >90% Übereinstimmung, *A. nidulans* 85% und *A. ustus* 33% auf Platten die mit einem 10^3 KBE/ml Inokulum für 48 Stunden inkubiert wurden. Ein Inokulum von 10^4 KBE/ml und eine 72 Std. Inkubation ergab eine >90% Übereinstimmung für Itraconazol und amphotericin B (6).
13. Die Korrelation der Caspofungin-MHK zu Behandlung mit Caspofungin wurde noch nicht durchgeführt. (9)

- 14.** Die Performanz von YeastOne® für Anidulafungin, Caspofungin und Micafungin gegen Cryptococcus, Aspergillus spc. und schnellwachsende nicht Candida Spc. wurde noch nicht bestimmt. Die MHK von Anidulafungin, Caspofungin und Micafungin Werte sollen deshalb nur für Candida Spezies berichtet werden.
- 15.** Die Performanz von YeastOne® für Posaconazol gegen Cryptococcus wurde noch nicht bestimmt.
- 16.** Zur Meldung von Ergebnissen mit CE IVD- und FDA-zugelassenen Sensititre-Produkten dürfen nur von Sensititre unterstützte Instrumente, d.h. eine einfache Spiegelbetrachtungsoptik, Sensitouch, Vizion, Sensititre Autoreader, Optiread und ARIS verwendet werden; andere verwendete Systeme werden nicht unterstützt.

LEISTUNG

Listen, die entweder manuell oder automatisch gelesen werden, sind dafür ausgelegt, eine vergleichbare Leistung zum CLSI -Referenz-Mikro-Bouillon-Verfahren bereitzustellen (1). Eine vergleichbare Leistung ist als Übereinstimmung von $\geq 90\%$ zu einer Verdopplungsverdünnung des Referenz-MIC definiert.

Um weitere Informationen zu erhalten, wenden Sie sich bitte an TREK Diagnostic Systems oder Ihren lokalen Händler.

LITERATUR

- (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.
- (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., Holiday, N., Killian, S. (2002). Sensititre YeastOne® colorimetric antifungal panel for testing voriconazole against Isolates of *Candida* spp., a comparison with the NCCLSI 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., 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, posaconazole 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) Holiday, 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-Infgriff, 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

HAFTUNGSAUSSCHLUSS

Die in diesem technischen Merkblatt enthaltenen Informationen sind zum Zeitpunkt der Drucklegung aktuell und können sich jederzeit ändern.

Die neuesten Informationen können vom www.trekds.com\techinfo oder durch in Verbindung tretende technische Dienstleistungen des TREK downloadet werden.
Übersetzt werden



Hergestellt von TREK Diagnostic Systems
Units 17-19 Birches Industrial Estate, East Grinstead,
West Sussex, RH19 1XZ, UK
Tel: +44-1342-318777

Vertrieb durch TREK Diagnostic Systems
982 Keynote Circle, Suite 6, Cleveland, Ohio 44131
Kundendienst USA 1 (800) 642-7029



029-Yeast-ROW-IVD-D-V2.0
Date Updated: 6 August 2012

SENSITITRE®
YEASTONE®

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση

Για λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τις πλάκες, συμπεριλαμβανομένης της διάταξης των πλακών, των στοιχείων ποιοτικού ελέγχου, επισκεφτείτε την ιστοσελίδα www.trekds.com/techinfo. Απαιτείται ο κωδικός πλάκας και ο αριθμός παρτίδας.

ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Το σύστημα ευαισθησίας Sensititre® είναι ένα *in vitro* διαγνωστικό προϊόν για εξέταση ευαισθησίας μη απαιτητικών ζυμομυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* και διαφόρων άλλων ταχέως αναπτυσσόμενων ειδών ζυμομυκήτων.

Είναι μια μέθοδος μικροζωμού που παρέχει ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) σε μορφή αποξηραμένης πλάκας. Ο ζωμός που παρασκευάζεται από την TREK Diagnostic Systems έχει πιστοποιηθεί μόνο με προϊόντα Sensititre®.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ

Η εξέταση ευαισθησίας ζυμομυκήτων Sensititre® είναι μια χρωματομετρική εξέταση μικροαραίωσης. Σε κάθε πλάκα χρηγούνται αντιμυκητικοί παράγοντες σε κατάλληλες αραίωσεις και ένας χρωματομετρικός δείκτης.

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με μη αυτόματο τρόπο με παρατήρηση της κατώτατης αντιμυκητικής συγκέντρωσης που εμφανίζει αναστολή της ανάπτυξης (όπως αποδεικνύεται από την απουσία χρωματικής μεταβολής).

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

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

Το σύστημα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνον από προσωπικό εκπαιδευμένο σε τεχνικές εξέτασης ευαισθησίας.

Επειδή οι ζώντες μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται με αυτό το προϊόν μπορεί να λοιμώδεις στον χρήστη, θα πρέπει να γίνεται ο κατάλληλος χειρισμός και να ακολουθούνται οι κατάλληλες μέθοδοι απόρριψης.

ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ

Οι πλάκες πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C) μακριά από άμεσο ηλιακό φως και άμεσες πηγές θερμότητας. Κάθε πλάκα συσκευάζεται σε λεπτό φύλλο με αποξηραντικό υλικό σίλικα ζελ. Μη χρησιμοποιείτε την πλάκα ή τον ζωμό εάν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης, εάν το χρώμα του αποξηραντικού υλικού δεν είναι μπλε ή πορτοκάλι ή εάν η θήκη από λεπτό φύλλο έχει υποστεί ζημιά.

Ενοφθαλμίστε την πλάκα εντός 5 ωρών από την αφαίρεση από τη θήκη.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρεχόμενα υλικά:

Πλάκα ευαισθησίας YeastOne®

Αυτοκόλλητη σφράγιση

Μη παρεχόμενα Υλικά [TREK Inc. Κωδικός προϊόντος]:

Απιοντισμένο νερό Sensititre® [T3339]

Ζωμός ενοφθαλμίσματος ευαισθησίας ζυμομυκήτων Sensititre® [Y3462]

Περιέκτες Sensititre® (για χρήση με το AutoInoculator®/ AIM®) [E3010]

Sensititre® AutoInoculator® [V3010] /Sensititre® AIM® [V3020]

Sensititre® Vizion® [V2021]

Sensititre® Nephelometer® [V3011]

Μη αυτόματη συσκευή παρακολούθησης

Πρότυπο θολερότητας McFarland 0,5 [E1041]

Βακτηριολογικός κρίκος

Πιπέτα των 20μl

Δοχείο στείρου ενοφθαλμίσματος

Σύστημα πιπετών των 100 μl και αναλώσιμα ρύγχη

Στελέχη ποιοτικού ελέγχου

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

Θάλαμος επώασης 34-36°C, χωρίς CO₂

Αναμείκτης περιδίνησης

Τρέχοντα έγγραφα της CLSI

Aspergillus spp μόνο

Άγαρ Takashio ή δεξτρόζης γεωμήλων

Βαμβακοφόρος στειλεός

Στείρο αλατούχο διάλυμα με 0,05% Tween 20

Φασματοφωτόμετρο

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται, να μεταφέρονται, να φυλάσσονται και κατόπιν να επιστρώνονται σε πλάκες πάνω σε πρωτογενές υλικό απομόνωσης, για το σχηματισμό απομονωμένων αποικιών με χρήση πρότυπων διαδικασιών. (1)

ΕΠΙΛΟΓΗ ΖΩΜΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΕΤΑΣΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

Η απόδοση των ζωμών που έχουν εγκριθεί από την Sensititre® έχει ελεγχθεί για χρήση με προϊόντα ευαισθησίας Sensititre®.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ (*Candida* και *Cryptococcus* spp.)

Αφήστε όλους τους ζωμούς να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν τη χρήση.

Συνιστάται τελική πυκνότητα μικροοργανισμών $1,5 - 8 \times 10^3$ CFU/ml περίπου.

1. Επιλέξτε διάφορες καλά απομονωμένες αποικίες διαμέτρου >1 mm από μια καθαρή καλλιέργεια 24 ωρών του απομονωμένου στελέχους ζυμομυκήτων και γαλακτωματοποιήστε σε στείρο νερό. Αναμείξτε με περιδίνηση το εναιώρημα επί 15 δευτερόλεπτα, διασφαλίζοντας ότι το εναιώρημα είναι ομοιόμορφο. Εάν παρουσιαστεί συσσωμάτωση, αφήστε τα συσσωματώματα να κατασταλάξουν πριν από τη ρύθμιση της πυκνότητας. Ρυθμίστε σε πρότυπο McFarland 0,5 οπτικά ή με χρήση νεφελόμετρου Sensititre®.

2. Μεταφέρετε 20 μl του εναιωρήματος σε 11 ml ζωμού ενοφθαλμίσματος YeastOne®. Για να σχηματιστεί ενοφθάλμισμα $1,5 - 8 \times 10^3$ CFU/ml.

Τα βήματα 1 και 2 πρέπει να ολοκληρώνονται σε 15 λεπτά.

3. Μεταφέρετε 100 μl με έναν από τους δύο παρακάτω τρόπους:

α. **Sensititre® Autolnocolator®/ Sensititre AIM®.** Αντικαταστήστε το πώμα του σωληναρίου με περιέκτη Sensititre® μίας χρήσης και ενοφθαλμίστε την πλάκα σύμφωνα με τις οδηγίες του Autolnocolator®/AIM®

Απομακρύνετε το συνδυασμό δοκιμαστικού σωλήνα και δοσιμετρικής κεφαλής από το Autolnocolator® μέσα σε 30 δευτερόλεπτα από τη χορήγηση δόσης σε μια πλάκα και αποθηκεύστε τα ανεστραμμένα σε ένα πλαίσιο ή απορρίψτε τα.

β. **Χειροκίνητη πιπέτα.** Εκχύστε το ζωμό σε στείριο δοχείο εμβολιασμού και ενοφθαλμίστε την πλάκα με χρήση κατάλληλης πιπέτας.

Ενοφθαλμίστε το ζωμό σε μια πλάκα εντός 15 λεπτών.

4. Πρέπει να γίνεται έλεγχος του αριθμού αποικιών με αφαίρεση 10 μl από την υποδοχή θετικού ελέγχου και επίστρωση πάνω σε άγαρ δεξτρόζης Sabauoud (SDA). Σε ένα σωστό ενοφθάλμισμα θα σχηματιστούν 10-80 αποικίες.

5. Καλύψτε όλες τις υποδοχές με την αυτοκόλλητη σφράγιση. Αποφεύγετε τις πτυχές διότι είναι δυνατό να οδηγήσουν σε παραλείψεις.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΝΟΦΘΑΛΜΙΣΜΟΥ (*Aspergillus spp.*) (5-7, 22)

Αφήστε όλους τους ζωμούς να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν τη χρήση.

1. Ανακαλλιεργήστε από το άγαρ δεξτρόζης Sabouraud πάνω σε άγαρ Tasashio ή δεξτρόζης γεωμήλων. Επωάστε επί 7 ημέρες στους 35°C για τη λήψη επαρκούς σπορίωσης.

2. Συλλέξτε τα κονίδια με βαμβακοφόρο στειλεό και εναιωρήστε σε στείριο αλατούχο διάλυμα με Tween.

3. Αφήστε τα βαριά σωματίδια να κατασταλάξουν επί 3-5 λεπτά.

4. Συλλέξτε το υπερκείμενο και αναμείξτε με αναμείκη περιδίνησης.

5. Ρυθμίστε τη θολερότητα του υπερκείμενου σε περατότητα 80-82% στα 530 nm, η οποία μετράται με φασματοφωτόμετρο ισοδύναμο με ενοφθάλμισμα $0,6 - 5 \times 10^6$ cfu/ml. Εναλλακτικά, ρυθμίστε σε πρότυπο McFarland 0,5 (22).

6. Προσθέστε 100 μl σε 11 ml ζωμού ενοφθαλμίσματος YeastOne® για να σχηματιστεί τελικό ενοφθάλμισμα $0,5-5 \times 10^4$ cfu/ml.

7. Μεταφέρετε 100 μl με έναν από τους δύο παρακάτω τρόπους:

α. **Sensititre® Autolnocolator®/Sensititre AIM®.** Αντικαταστήστε το πώμα του σωληναρίου με περιέκτη Sensititre® μίας χρήσης και ενοφθαλμίστε την πλάκα σύμφωνα με τις οδηγίες του Autolnocolator®/AIM®.

Απομακρύνετε το συνδυασμό δοκιμαστικού σωλήνα και δοσιμετρικής κεφαλής από το Autolnocolator® μέσα σε 30 δευτερόλεπτα από τη χορήγηση δόσης σε μια πλάκα και αποθηκεύστε τα ανεστραμμένα σε ένα πλαίσιο ή απορρίψτε τα.

β. **Χειροκίνητη πιπέτα.** Εκχύστε το ζωμό σε στείριο δοχείο εμβολιασμού και ενοφθαλμίστε την πλάκα με χρήση κατάλληλης πιπέτας.

Ενοφθαλμίστε το ζωμό σε μια πλάκα εντός 15 λεπτών.

8. Πρέπει να γίνεται έλεγχος του αριθμού αποικιών με αφαίρεση 10 μl από την υποδοχή θετικού ελέγχου και επίστρωση πάνω σε άγαρ δεξτρόζης Sabauoud (SDA). Σε ένα σωστό ενοφθάλμισμα θα σχηματιστούν 50-500 αποικίες.

9. Καλύψτε όλες τις υποδοχές με την αυτοκόλλητη σφράγιση. Αποφεύγετε τις πτυχές διότι αυτές είναι δυνατό να οδηγήσουν σε παραλείψεις.

ΕΠΩΑΣΗ

Επωάστε τις πλάκες επί 24-25 ώρες τουλάχιστον στους 35°C σε θάλαμο επώασης χωρίς CO₂. Τα είδη *Cryptococcus* πρέπει να επωάζονται επί 72 ώρες.
Τα είδη *Aspergillus* πρέπει να επωάζονται επί 48 έως 72 ώρες.

Η επώαση σε θερμοκρασίες >35°C* ενδέχεται να επηρεάσει την απόδοση των πλακών.

Είναι δυνατό να στοιβαχθούν έως 3 πλάκες, εάν δεν επωάζονται στο ARIS®.

ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ

Η οπτική ανάγνωση των πλακών μπορεί να γίνει σε κανονικό εργαστηριακό φωτισμό με χρήση ενός χειροκίνητου κατόπτρου προβολής ή με χρήση του συστήματος Sensititre Vizion®. Για πρόσθετες πληροφορίες ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του Vizion.

Η ανάπτυξη των ζυμομυκήτων στα αντιμυκητικά διαλύματα θα είναι εμφανής ως μεταβολή του δείκτη χρωματομετρικής ανάπτυξης από κυανό (αρνητικό) σε ερυθρό (θετικό).

Μερικοί ζυμομύκητες ενδέχεται να μη μεταβάλλουν το χρώμα του δείκτη εντελώς σε ερυθρό, αλλά να εμφανίζουν περισσότερο μωβ απόχρωση του δείκτη. Κάποιοι μικροοργανισμοί ενδέχεται να εμφανίζουν ελαφρά μωβ απόχρωση κατά την προσθήκη πιοζακοναζόλης, βορικοναζόλη φλουκοναζόλης, ιτρακοναζόλης και κετοκοναζόλης (βλ λεπτομέρειες για την ανάγνωση παρακάτω).

1. Εξετάστε την υποδοχή θετικής ανάπτυξης έπειτα από 24 ώρες επώασης. Εάν η υποδοχή ανάπτυξης είναι ερυθρή, τα τελικά σημεία για τους αντιμυκητικούς παράγοντες είναι δυνατό να ερμηνευτούν. Εάν η υποδοχή είναι ακόμα κυανή ή μόνον αμυδρώς μωβ, επανεπωάστε επί 24 ώρες επιπλέον και επανεξετάστε.

ΜΗ ΜΕΤΡΑΤΕ ΤΗ ΘΟΛΕΡΟΤΗΤΑ ΣΤΙΣ ΠΛΑΚΕΣ SENSITITRE YEASTONE®.

Μετρήστε μόνον τη χρωματική μεταβολή.

2. Η MIC είναι η κατώτατη συγκέντρωση ενός αντιμυκητικού παράγοντα που αναστέλλει ουσιωδώς την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, όπως ανιχνεύεται με χρωματική μεταβολή. Ο βαθμός της χρωματικής μεταβολής στις υποδοχές που περιέχουν τον παράγοντα πρέπει να συγκρίνεται με το χρώμα των υποδοχών ελέγχου θετικής ανάπτυξης.

3. Ανάπτυξη δε λαμβάνει χώρα όταν δεν υπάρχει μεταβολή στον κυανό δείκτη σε οποιαδήποτε αραίωση ενός αντιμυκητικού παράγοντα. Ο μικροοργανισμός είναι ευαίσθητος στην κατώτατη συγκέντρωση του αντιμυκητικού παράγοντα.

4. Η MIC καταγράφεται ως η κατώτατη συγκέντρωση του αντιμυκητικού παράγοντα που αποτρέπει την εμφάνιση ερυθρού ή μωβ χρώματος σε υποδοχή ανάπτυξης, δηλ. πρώτα κυανό χρώμα.

5. Ο μικροοργανισμός είναι ανθεκτικός στην ανώτατη συγκέντρωση του αντιμυκητικού παράγοντα όταν παρατηρείται ανάπτυξη σε όλες τις υποδοχές. Το τελικό σημείο MIC πρέπει να καταγράφεται ως “μεγαλύτερο από” (>) την ανώτατη συγκέντρωση.

6. Για τα είδη *Aspergillus* λάβετε τη μέτρηση της MIC ως την κατώτατη συγκέντρωση με κυανό χρώμα.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Παρουσίαση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων εξέτασης που ενδέχεται να εμφανιστούν.

Συγκέντρωση υποδοχής µg/ml							R = ΕΡΥΘΡΟ: Ένδειξη θετικής ανάπτυξης B = KYANO: Ένδειξη αρνητικής ανάπτυξης
	1	2	4	8	16	32	
A.	R	R	R	B	B	B	Ανάπτυξη σε όλες τις υποδοχές. Το τελικό σημείο MIC είναι >32 µg/ml.
B.	R	R	R	R	R	R	Ανάπτυξη σε όλες τις υποδοχές. Το τελικό σημείο MIC είναι >32 µg/ml.
C.	B	B	B	B	B	B	Απουσία ανάπτυξης σε οποιαδήποτε υποδοχή. Το τελικό σημείο MIC είναι ≤1 µg/ml.
D.	R	R	R	B	R	R	“Παραληφθείσα υποδοχή”. Το τελικό σημείο MIC είναι >32 µg/ml. Αγνοήστε την “παράλειψη” όταν οι υποδοχές σε οποιαδήποτε πλευρά εμφανίζουν ανάπτυξη. Εάν παρουσιαστούν περισσότερες από μία “παραλείψεις” σε μια στήλη, τα αποτελέσματα των εξετάσεων καθίστανται άκυρα ¹ .
E.	R	R	B	B	R	R	Διπλή “παραληφθείσα υποδοχή”. Η εξέταση πρέπει να επαναλαμβάνεται. ¹

¹ Με εφαρμογή προσεκτικής τεχνικής, οι εμφανίσεις αυτές είναι σπάνιες.

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ

Αμφοτερικίνη B. Για την αμφοτερικίνη B στις 24 ώρες, τα τελικά σημεία ορίζονται τυπικά εύκολα και η MIC μετράται ως η κατώτατη συγκέντρωση φαρμάκου που αποτρέπει οποιαδήποτε διακριτή χρωματική μεταβολή. Με την αμφοτερικίνη B δεν απαντώνται συνήθως τελικά σημεία που να σχηματίζουν ουρά.

Το πρώτο τρυβλίο που εμφανίζει διακριτή χρωματική μεταβολή σε σύγκριση με το τρυβλίο θετικής ανάπτυξης είναι η MIC.



Αντιμυκητικοί παράγοντες με φλουκυτοσίνη και αζόλες. Το *Candida albicans*, το *C. glabrata* και το *C. tropicalis* με φλουκυτοσίνη και αζόλες, όπως φλουκοναζόλη, ιτρακοναζόλη, κετοκοναζόλη, βορικοναζόλη και ποζακοναζόλη ενδέχεται να δώσουν τελικά σημεία τυπικά λιγότερο απότομα, λόγω ανάπτυξης που σχηματίζει ουρά και ενδέχεται να αποτελούν σημαντική αιτία μεταβλητότητας. Σχηματισμός ουράς εμφανίζεται όταν μια ελαφρά χρωματική μεταβολή επιμένει και είναι συχνά πανόμοια για όλες τις συγκεντρώσεις φαρμάκων πάνω από τη MIC. Η ανάγνωση της MIC πρέπει να πραγματοποιείται ως η πρώτη υποδοχή που εμφανίζει λιγότερο έντονη χρωματική μεταβολή σε σύγκριση με την υποδοχή ελέγχου θετικής ανάπτυξης. Στελέχη αναφοράς καθορισμένης ευαισθησίας είναι δυνατόν επίσης να βοηθήσουν στην εκπαίδευση του προσωπικού. Απομονωμένα στελέχη του *Candida krusei* υποτίθεται ότι είναι ενδογενώς

ανθεκτικά στη φλουκοναζόλη και οι MIC τους δεν πρέπει να ερμηνεύονται. (1) Το αποτέλεσμα εξέτασης που αναφέρεται πρέπει να συνοδεύεται από σχόλιο.

Τελικό σημείο: εμφανίζεται όταν μια αμυδρή χρωματική μεταβολή επιμένει και συχνά είναι όμοια σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η MIC πρέπει να θεωρείται ως το πρώτο τρυβλί που εμφανίζει λιγότερο διακριτή χρωματική μεταβολή σε σύγκριση με το τρυβλί μάρτυρα θετικής ανάπτυξης.



Echinocandins. Τα τελικά σημεία MIC πρέπει να προσδιορίζονται μετά από 24 ώρες επώασης στους 35°C. Το MIC πρέπει να θεωρείται ως το πρώτο τρυβλί που εμφανίζει λιγότερο έντονη χρωματική αλλαγή σε σύγκριση με το τρυβλί θετικού μάρτυρα.



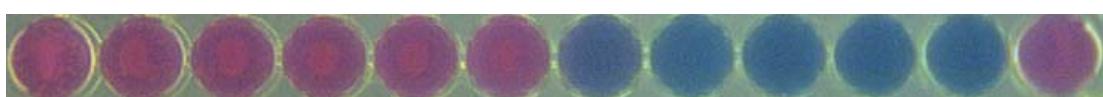
Ιτρακοναζόλη:

Ιτρακοναζόλη μπορεί περιστασιακά να προκύπτει από διάλυμα σε συγκεντρώσεις ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα το αντίστοιχο τρυβλί να παρουσιάζει ανάπτυξη και να γίνεται κόκκινο.



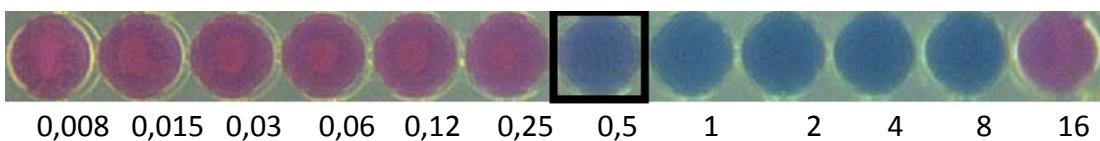
Κατά διαστήματα αντιμετωπίζουμε παράδοξη ανάπτυξη στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ιτρακοναζόλης στα πάνελ ευαισθησίας ζυμομυκήτων, κάτι που οδηγεί σε ροζ χρωματισμό των θέσεων. Το παράδοξο αποτέλεσμα, γνωστό και ως φαινόμενο Eagle, αναφέρεται σε μια παρατήρηση, όπου η αύξηση της αντιμικροβιακής συγκέντρωσης πέραν ενός ορισμένου σημείου, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των βακτηρίων που επιβιώνουν. Μια εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι καθώς η συγκέντρωση γίνεται ιδιαίτερα υψηλή, ο παράγοντας ενδέχεται να αυτο-ανταγωνίζεται τον υποδοχέα με τον οποίο συνδέεται (π.χ. πρωτεΐνες πρόσδεσης της πενικιλίνης, στην περίπτωση της πενικιλίνης).

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



Αντιμετώπιση

Η ανάπτυξη στις υψηλές συγκεντρώσεις θα πρέπει να αγνοείται, εκτός εάν εμφανίζεται σε όλες τις άλλες συγκεντρώσεις ιτρακοναζόλης. Στο παράδειγμα που ακολουθεί, η θέση 0,5µg/ml που επισημαίνεται με το μαύρο τετράγωνο είναι εκεί που θα πρέπει να καταγραφεί το αποτέλεσμα MIC.



Για οποιεσδήποτε ερωτήσεις ή διευκρινίσεις, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης στο τηλέφωνο +441342318777 ή μέσω e-mail στη διεύθυνση techsupport@trekds.co.uk.

Εναλλακτικά, επικοινωνήστε στο τηλέφωνο +1-800-871-8909 ή μέσω e-mail στη διεύθυνση techsupport@trekds.com για τις Η.Π.Α.

Μόλυνση/ Παραλείψεις

Εναλλακτικά, ένα ροζ τρυβλίο (ανάπτυξη) μεταξύ των μπλε τρυβλίων (όχι ανάπτυξη) μπορεί να είναι ενδεικτικό της μόλυνσης. Υποκαλλιεργήστε τα περιεχόμενα του τρυβλίου προκειμένου να επαληθεύσετε την αιτία.

Ένα μπλε τρυβλίο σε μια σειρά κόκκινων τρυβλίων ανάπτυξης υποδεικνύει “παράλειψη” και πρέπει να αγνοηθεί. Η MIC θα πρέπει να θεωρείται πάνω από τυχόν τρυβλία που έχουν παραλειφθεί. Αν έχουν παραλειφθεί περισσότερα από ένα τρυβλία, ο αντιμυκητικός δεν πρέπει να αναφερθεί.



ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η συχνότητα των εξετάσεων ποιοτικού ελέγχου πρέπει να είναι σύμφωνα με τις τοπικές κατευθυντήριες οδηγίες (1).

Το ενοφθάλμισμα πρέπει να καλλιεργείται πάνω σε κατάλληλο υλικό για τον έλεγχο της καθαρότητας. Τα αποτελέσματα των εξετάσεων είναι άκυρα εάν ανιχνευτεί μεικτή καλλιέργεια.

Όλες οι πλάκες Sensititre® περιλαμβάνουν υποδοχές θετικού ελέγχου. Οι εξετάσεις είναι άκυρες εκτός εάν υπάρχει διακριτή ανάπτυξη σε όλες τις υποδοχές θετικού ελέγχου.

Για ποιοτικό έλεγχο από το χρήστη του συστήματος MIC, συνιστώνται οι ακόλουθες καλλιέργειες από την American Type Culture Collection (ATCC®):

<i>Candida krusei</i> *	ATCC® 6258
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC® 22019

*Η ATCC αναφέρει πλέον τους μικροοργανισμούς αυτούς ως *Issatchenkia orientalis*.

Τα αποτελέσματα **δεν** πρέπει να αναφέρονται εάν τα αποτελέσματα ποιοτικού ελέγχου δεν είναι εντός του εύρους τιμών.

Στον πίνακα 3 παρέχονται οι αναμενόμενες τιμές ποιοτικού ελέγχου.

Επικοινωνήστε με το διανομέα της Sensititre® ή με την TREK Diagnostic Systems σε περίπτωση που δεν είναι δυνατό να επιλυθούν τυχόν ασυμφωνίες ποιοτικού ελέγχου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Συνιστώμενα εύρη τιμών MIC 24 και 48 ωρών για στελέχη ποιοτικού ελέγχου (μg/ml).

Είναι υπογραμμισμένα τα εύρη τα οποία είναι διαφορετικά ή επιπρόσθετα στα δημοσιευμένα εύρη του ποιοτικού ελέγχου(1)

Αντιμυκητικός παράγοντας	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258		<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	
	24 ώρες	48 ώρες	24 ώρες	48 ώρες
Ποζακοναζόλη	0.06 - 0.5	0.12-1	0.06 - 0.25	0.06 - 0.25
Ανιδουλαφουνγκίνη	0.03-0.12	-	0.25-2	-
Αμφοτερικίνη B	0.5 – 2	1-4	0.25 – 2	0.5 - 4
Φλουκοναζόλη	8 – 64	16 - 128	0.5 - 4	<u>2 - 8</u>
Μικαφουνγκίνη	<u>0.06-0.25</u>	0.12-0.5	0.5 - 2	0.5 - 4
Ιτρακοναζόλη	0.12 - 1	0.25 - 1	0.12 - 0.5	0.12 - 0.5
Κετοκοναζόλη	0.12 – 1	0.25 - 1	0.03 – 0.25	0.06 - 0.5
5 - Φλουκυτοσίνη	4 - 16	8 - 32	<u>0.12 - 0.5</u>	0.12 - 0.5
Βορικοναζόλη	0.06 – 0.5	0.12 - 1	0.015 – 0.12	0.03 - 0.25
Κασποφουνγκίνη	0.12 - 1	0.25 - 1	0.25 - 1	0.5 - 4

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Ερμηνευτικά κριτήρια MIC (μg/ml) για είδη *Candida* (CLSI M27)

Αντιμυκητικός παράγοντας	Ευαίσθητο	Ευαίσθητο δοσο-εξαρτώμενο	Ενδιάμεσο	Ανθεκτικό	είναι Ευαίσθητο
Ανιδουλαφουνγκίνη	<u>≤2</u>				>2
Κασποφουνγκίνη	<u>≤2</u>				>2
Φλουκοναζόλη*	<u>≤8</u>	16 - 32		<u>>64</u>	
Ιτρακοναζόλη	<u>≤0.125</u>	0.25 - 0.5		<u>>1</u>	
Φλουκυτοσίνη	<u>≤4</u>		8 - 16	<u>>32</u>	
Μικαφουνγκίνη	<u>≤2</u>				>2
Βορικοναζόλη	<u>≤1</u>	2		<u>>4</u>	

Τα απομονωμένα στελέχη του *Candida krusei* θεωρούνται ότι είναι εγγενώς ανθεκτικά στη φλουκοναζόλη και οι τιμές τους MIC δεν πρέπει να ερμηνεύονται χρησιμοποιώντας αυτή την κλίμακα

ΣΗΜΕΙΩΣΗ 1: Εμφανίζονται τα σημεία αναστολής ($\mu\text{g/mL}$) για το είδος *Candida* spp. σε σχέση με τους υποδεικνύμενους παράγοντες. Εάν οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC) μετρηθούν χρησιμοποιώντας μια κλίμακα και τα αποτελέσματα εμπίπτουν ανάμεσα στις κατηγορίες, τότε υπονοείται η επόμενη υψηλότερη κατηγορία. Κατά συνέπεια, ένα απομονωμένο στέλεχος με τιμή MIC φλουκοναζόλης ίση με 12,5 $\mu\text{g/mL}$ θα τοποθετηθεί στην κατηγορία S-DD.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, βλ. τα πρότυπα CLSI (1).

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

1. Οι πλάκες Sensititre YeastOne[®] προορίζονται για χρήση με μη απαιτητικούς ζυμομύκητες, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* και διαφόρων ταχέως αναπτυσσόμενων ειδών ζυμομυκήτων. Δεν προορίζονται για απαιτητικούς ή βραδέως αναπτυσσόμενους ζυμομύκητες, όπως οι *Histoplasma* ή οι *Blastomycetes* και οι νηματώδεις μύκητες.

2. Αξιολογήθηκε η σύγκριση μεταξύ του Sensititre YeastOne[®] στις 24 ώρες και της μεθόδου αναφοράς του CLSI στις 48 ώρες. Ωστόσο, λόγω της δυσκολίας στη συσχέτιση των τελικών σημείων των μικροοργανισμών (*C. albicans*) που σχηματίζουν ουρά σε επώαση 48 ωρών, παρατηρούνται υψηλά ποσοστά σφάλματος.

3. Η εξέταση των μυκήτων και των αντιμυκητικών παραγόντων είναι εγγενώς λιγότερο ακριβής από την εξέταση βακτηριδίων.

4. Μερικοί ερευνητές πιστεύουν ότι η ανάγνωση στις 24 ώρες είναι πιο κατάλληλη από την ανάγνωση στις 48 ώρες εξαιτίας του προβλήματος με το σχηματισμό ουράς με ορισμένα απομονωμένα στελέχη. Το επίσημο πρότυπο του CLSI

υποδεικνύει ότι οι αναγνώσεις πρέπει να επιτυγχάνονται στις 48 ώρες. Έως τη συλλογή και την ανάλυση επαρκών δεδομένων, το ερώτημα του πλέον κλινικώς σχετικού χρόνου της ανάγνωσης παραμένει χωρίς απάντηση. Η αναφορά των αποτελεσμάτων πρέπει να υποδεικνύει σαφώς τους χρόνους ανάγνωσης.

5. Για επιπλέον καθοδήγηση, συνιστάται η ανασκόπηση του CLSI Antifungal Susceptibilities Standard M27 (Πρότυπο M27 ευαισθησιών σε αντιμυκητικούς παράγοντες).

6. Η χρωματική μεταβολή είναι ο δείκτης του τελικού σημείου, όχι η θολερότητα. (Το γεγονός αυτό απαλλάσσει από μερικές σημαντικές ανησυχίες σχετικά με την ερμηνεία ορισμένων ειδών *Candida* λόγω του φαινομένου “σχηματισμού ουράς”. Ο σχηματισμός ουράς παρατηρείται περισσότερο με απομονωμένα στελέχη εκτός από εκείνα του αίματος και άλλων στείρων σωματικών υγρών.)

7. Μην πραγματοποιήσετε την ανάγνωση στις 24 ώρες εάν η υποδοχή ελέγχου δεν έχει μεταβληθεί εντελώς σε θετική.

8. Η απόδοση της βορικοναζόλης με τα είδη *Cryptococcus* και τα ταχέως αναπτυσσόμενα είδη ζυμομυκήτων δεν έχει προσδιοριστεί. Επομένως, οι MIC της βορικοναζόλης πρέπει αναφέρονται μόνο για είδη *Candida*.

9. Χρησιμοποιείτε μόνο με ζωμό ενοφθαλμίσματος ευαισθησίας ζυμομυκήτων εγκεκριμένο από την Sensititre[®]. Η χρήση άλλων ζωμών θα ήταν δυνατό να έχει ως αποτέλεσμα σφάλμα.

10. Όπως με οποιαδήποτε *in vitro* μέθοδο εξέτασης ευαισθησίας, τα αποτελέσματά της πρέπει να συσχετίζονται με την κλινική απόκριση του ασθενούς στη θεραπεία που έχει οριστεί.

11. Η απόδοση έχει επιβεβαιωθεί μόνο για την αμφοτερική B, την Ιτρακοναζόλη Ποζακοναζόλη και την Βορικοναζόλη με είδη *Aspergillus*.

12. Η αναφορά 5 εμφάνισε υψηλό επίπεδο συμφωνίας (>99%) με τη μέθοδο CLSI για την αμφοτερική B και τα είδη *Aspergillus*. Κατώτερη συμφωνία διαπιστώθηκε με την ιτρακοναζόλη. Το *A. fumigatus*, το *A. flavus* και το *A. terrus* είχαν συμφωνία >90% ενώ το *A. nidulans* είχε συμφωνία 85% και το *A. ustus* 33% σε πλάκες που επωάστηκαν επί 48

ώρες με ενοφθάλμισμα 10^3 cfu/ml. Συμφωνία πάνω από 90% παρατηρήθηκε με ενοφθάλμισμα 10^4 cfu/ml και επώαση 72 ωρών με ιτρακοναζόλη και αμφοτερικίνη B (6).

13. Συσχέτιση της MIC για την Caspofungin με το θεραπευτικό αποτέλεσμα μετά τη χορήγηση Caspofungin, δεν έχει καθιερωθεί πλήρως.

14. Επιδόσεις του YeastOne[®] με Ανιδουλαφουνγκίνη, Κασποφουνγκίνη και Μικαφουνγκίνη με Cryptococcus, με είδη Aspergillus και ταχέως αναπτυσσόμενα είδη άλλα εκτός από είδη Candida, δεν έχουν εδραιωθεί. Ανιδουλαφουνγκίνη, Κασποφουνγκίνη και Μικαφουνγκίνη MIC εν τούτοις θα πρέπει να αναφέρονται μόνο για στελέχη Candida.

15. Επιδόσεις του YeastOne[®] με Ποζακοναζόλη με Cryptococcus δεν έχουν εδραιωθεί.

16. Μόνο τα όργανα που υποστηρίζει η Sensititre π.χ. το απλό εικονοσκόπιο με καθρέφτη, τα Sensitouch, Vizion, Sensititre Autoreader, Optiread και ARIS θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για την έκθεση αποτελεσμάτων με προϊόντα Sensititre που έχουν έγκριση CE IVD και FDA, εάν χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε άλλο σύστημα δεν θα υπάρχει υποστήριξη.

ΑΠΟΔΟΣΗ

Οι πλάκες των οποίων η ανάγνωση γίνεται είτε μη αυτόματα είτε αυτόματα, έχουν σχεδιαστεί για να δίνουν συγκρίσιμη απόδοση με τη διαδικασία μικροζωμού αναφοράς του CLSI. Η συγκρίσιμη απόδοση ορίζεται ως συμφωνία $> 90\%$ εντός μιας αραίωσης διπλασιασμού της MIC αναφοράς (1).

Για περαιτέρω πληροφορίες, επικοινωνήστε με την TREK Diagnostic Systems ή με τον τοπικό διανομέα σας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(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.

(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, Institute 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., Holiday, 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. 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 raruconazole. *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., *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) Holiday, 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-Infgriff, 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 refernce 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 ΕΥΘΥΝΗΣ

Οι πληροφορίες που παρέχονται στο παρόν ένθετο τεχνικών οδηγιών είναι οι πιο πρόσφατες πληροφορίες κατά το χρόνο εκτύπωσης και ενδέχεται να τροποποιηθούν χωρίς ειδοποίηση.

Για πρόσφατες πληροφορίες μπορείτε να αποτανθείτε στην ιστοσελίδα www.trekds.com\techinfo ή επικοινωνόντας με τις τεχνικές υπηρεσίες TREK.



Κατασκευάζεται από την TREK Diagnostic Systems
Units 17-19 Birches Industrial Estate, East Grinstead,
West Sussex. RH19 1XZ, UK
Τηλ.: +44-1342-318777

Διανέμεται από την TREK Diagnostic Systems,
982 Keynote Circle, Suite 6, Cleveland, Ohio 44131
Technical Service USA: 1 (800) 642-7029



029-Yeast-ROW-IVD-GR-V2.0
Date Updated: 06 August 2012



SENSITITRE®
YEASTONE®

A utiliser pour le diagnostic *in vitro*

Pour des informations complètes sur les plaques, y compris leurs dispositions, les informations relatives au contrôle qualité, veuillez visiter le site www.trekds.com/techinfo. Le code de la plaque et son numéro de lots seront requis.

UTILISATION PREVUE

Le système de sensibilité Sensititre® est un produit de diagnostic *in vitro* destiné à tester la sensibilité des levures non-exigeantes dont *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Aspergillus* sp. et diverses autres espèces de levures à croissance rapide.

Cette méthode de microdilution en milieu liquide fournit des résultats qualitatifs et quantitatifs de Concentration Inhibitrice Minimale (CMI) sous forme d'une plaque sèche. Le bouillon fabriqué par TREK Diagnostic Systems a été validé uniquement avec des produits Sensititre®.

PRINCIPES D'UTILISATION

Le test de sensibilité des levures Sensititre® est un test de microdilution colorimétrique. Chaque plaque est dosée avec des antifongiques aux dilutions appropriées, et avec un indicateur colorimétrique.

Les résultats sont lus manuellement par l'observation de la concentration antifongique la plus basse indiquant l'inhibition de la croissance (mise en évidence par l'absence de changement de couleur).

PRECAUTIONS

Les résultats devront être utilisés comme aide à la sélection du médicament à retenir pour le traitement.

Seul un personnel formé aux techniques des tests de sensibilité devra utiliser le système. Étant donné que les micro-organismes vivants utilisés avec ce produit peuvent être infectieux pour l'utilisateur, des méthodes correctes de manipulation et d'élimination doivent être suivies.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Les plaques devront être entreposées à température ambiante (15 à 25°C) loin de l'exposition directe aux rayons du soleil et à la chaleur. Chaque plaque est emballée dans une feuille contenant du gel de silice déshydratant. Ne pas utiliser la plaque ou le bouillon si la date limite est dépassée, si la couleur du dessiccatif n'est pas bleue ou orange ou si l'enveloppe en aluminium est endommagée.

Inoculer la plaque dans les 5 heures qui suivent sa sortie du sachet.

PROCEDURE

Matériel fourni :

Plaque de sensibilité YeastOne®

Fermeture adhésive

Matériel nécessaire non fourni [code produit TREK Inc] :

Eau déminéralisée Sensititre® [T3339]

Milieu liquide d'inoculum de sensibilité des levures Sensititre® [Y3462]

Têtes de dosage Sensititre® (à utiliser avec Autolnocolator®/ AIM® [E3010]

Autolnocolator® Sensititre® [V3010] / AIM® [V3020] Sensititre®

Vizion® Sensititre® [V2021]

Nephelometer® Sensititre [V3011]

Visionneuse manuelle [V4007]

Norme de turbidité 0,5 McFarland [E1041]

Anse bactériologique

Pipette 20µl

Réervoir d'inoculum stérile

Pipettor 100µl et embouts jetables

Souches de contrôle qualité

Plaques de milieu de culture fongique à l'agar-agar, par ex. gélose à dextrose de Sabouraud (SDA)

Etuve à culture 34-36°C, sans CO₂

Agitateur Vortex

Documents actuels du CLSI (NCCLS) (Commission nationale de normes de laboratoires d'analyses médicales)

Aspergillus sp. uniquement

Gélose à dextrose de Takashio ou de pomme de terre

Tampon de coton

Solution saline stérile Tween 20 à 0,05%

Spectrophotomètre

COLLECTE ET PREPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons devront être collectés, transportés, entreposés puis montés sur le milieu d'isolement primaire pour obtenir des colonies isolées à l'aide des procédures standard (1).

SÉLECTION DU BOUILLON DU TEST DE SENSIBILITÉ

Les performances des bouillons approuvés Sensititre® ont été mises à l'essai de sorte à ce qu'ils soient utilisés dans des produits de sensibilité Sensititre®.

PROCEDURE D'INOCULATION (*Candida* et *Cryptococcus* sp.)

Permettre à tous les bouillons de monter à température ambiante avant utilisation.

Une densité finale d'organismes d'environ 1,5 à 8 X 10³ cellules souches/ml est recommandée.

1. Prélever plusieurs colonies bien isolées de plus de 1mm de diamètre dans une culture pure de 24 heures de l'isolat de levure, et émulsifier dans l'eau stérile. Agiter la suspension au Vortex pendant 15 secondes, en veillant à ce que la suspension soit uniforme. S'il se produit des agglutinations, les laisser se déposer avant d'ajuster la densité. Ajuster visuellement selon une norme 0,5 McFarland ou en utilisant un néphélomètre Sensititre®

2. Transférer 20 µl de la suspension dans 11 ml de milieu liquide d'inoculum YeastOne®, pour obtenir un inoculum de 1,5 à 8 X 10³ cellules souches/ml.

Les étapes 1 et 2 devront être réalisées en 15 minutes.

3. Transférer 100 μ l en suivant l'une ou l'autre de ces méthodes :

a. **Autoinoculator® Sensititre® /AIM® Sensititre®**. Remplacer le capuchon du tube par une tête de dosage Sensititre® à usage unique, et inoculer la plaque selon le mode d'emploi de l'Autoinoculator® /AIM®.

Enlever la combinaison tube à essai / tête de dosage de l'Autoinoculator® / AIM® dans les 30 secondes après avoir doser une plaque et stocker inversée dans un présentoir ou jeter.

b. **Pipette manuelle**. Verser le milieu liquide dans une cuve d'ensemencement stérile et inoculer la plaque à l'aide d'une pipette appropriée.

Inoculer la plaque à l'aide du milieu liquide dans les 15 minutes.

4. Un contrôle du dénombrement des colonies devra être effectué en retirant 10 μ l de la cupule de contrôle positif et en les montant sur la plaque de gélose à dextrose de Sabouraud (SDA). Un inoculum correct produira 10 à 80 colonies.

5. Couvrir toutes les cupules avec la fermeture adhésive. Eviter les plis car ils pourraient entraîner des sauts.

PROCEDURE D'INOCULATION (*Aspergillus* sp.) (5-7, 22)

Permettre à tous les bouillons de monter à température ambiante avant utilisation.

1. Extraire une sous-culture de la gélose à dextrose de Sabouraud vers la gélose à dextrose de Takashio ou de pomme de terre. Etuver pendant 7 jours à 35°C pour obtenir une sporulation adéquate.

2. Collecter les conidies à l'aide d'un tampon de coton et les suspendre dans la solution saline stérile Tween.

3. Laisser les particules lourdes se décanter pendant 3 à 5 minutes.

4. Collecter le surnageant et agiter à l'aide d'un agitateur Vortex.

5. Ajuster la turbidité du surnageant entre 80 et 82% de facteur de transmission à 530nm, mesuré avec un spectrophotomètre, équivalent à un inoculum de 0,6 à 5×10^6 cellules souches/ml. Ou bien ajuster à l'échalon standard McFarland 0,5 (22).

6. Ajouter 100 μ l à 11ml de milieu liquide d'inoculum YeastOne® pour donner un inoculum final de 0,5 à 5×10^4 cellules souches/ml.

7. Transférer 100 μ l en suivant l'une ou l'autre de ces méthodes :

a. **Autoinoculator® Sensititre® /AIM® Sensititre®**. Remplacer le capuchon du tube par une tête de dosage Sensititre® à usage unique, et inoculer la plaque selon le mode d'emploi de l'Autoinoculator®.

Enlever la combinaison tube à essai / tête de dosage de l'Autoinoculator® / AIM® dans les 30 secondes après avoir doser une plaque et stocker inversée dans un présentoir ou jeter.

b. **Pipette manuelle**. Verser le milieu liquide dans une cuve d'ensemencement stérile et inoculer la plaque à l'aide d'une pipette appropriée.

Inoculer la plaque à l'aide du milieu liquide dans les 15 minutes.

8. Un contrôle du dénombrement des colonies devra être effectué en retirant 10 μ l de la cupule de contrôle positif et en les montant sur la plaque de gélose à dextrose de Sabouraud (SDA). Un inoculum correct produira 50 à 500 colonies.

9. Couvrir toutes les cupules avec la fermeture adhésive. Eviter les plis car ils pourraient entraîner des sauts.

INCUBATION

Au minimum, étuver les plaques pendant 24 à 25 heures à 35°C dans une étuve à culture sans CO₂.

Les *Cryptococcus* sp. devront être incubés pendant 72 heures.

Les *Aspergillus* sp. devront être incubés pendant 48 à 72 heures.

L'incubation à des températures supérieures à 35°C

*** risque d'affecter les performances de ces plaques.**

On peut empiler jusqu'à 3 plaques si elles ne sont pas étuvées avec le système de dosage ARIS®.

LECTURE DES RESULTATS DES TESTS

Les plaques peuvent être lues visuellement avec un éclairage de laboratoire normal utilisant une visionneuse miroir manuelle ou à l'aide du système Sensititre® Vizion®. Pour obtenir des informations complémentaires, référez-vous au manuel d'utilisation du Vizion. La croissance des levures dans les solutions antifongiques sera mise en évidence par le virage de l'indicateur colorimétrique de croissance du bleu (négatif) au rouge (positif). Certaines levures peuvent ne pas faire virer complètement l'indicateur au rouge, mais entraînent une prise de teinte plus pourprée de l'indicateur. Certains organismes peuvent montrer une légère coloration pourpre dans le posaconazole, le voriconazole, le fluconazole, l'itraconazole et le kétococonazole (voir les détails de lecture ci-après).

1. Examiner la cupule de croissance positive après 24 heures d'incubation. Si la cupule de croissance est rouge, les points de virage des antifongiques peuvent être interprétés. Si la cupule est restée bleue ou seulement vaguement pourprée, re-étuver pendant encore 24 heures et re-examiner.

NE PAS LIRE LA TURBIDITE SUR LES PLAQUES YEASTONE SENSITITRE®.

Ne lire que le changement de couleur.

2. La CMI représente la plus faible concentration d'un antifongique qui inhibe substantiellement la croissance de l'organisme, comme le détecte le changement de couleur. Le degré de changement de couleur dans les cupules contenant l'antifongique devra être comparé à la couleur des cupules de contrôle à croissance positive.

3. Aucune croissance n'est survenue s'il n'y a pas de virage de l'indicateur bleu à n'importe quelle dilution d'un antifongique. L'organisme est sensible à la plus faible concentration de l'antifongique.

4. La CMI est enregistrée comme la plus faible concentration de l'antifongique empêchant le développement d'une cupule de croissance rouge ou pourpre, c'est à dire en premier bleue.

5. L'organisme est résistant à la plus haute concentration de l'antifongique quand la croissance est observée dans les cupules. Le point de virage auquel la CMI devrait se trouver est enregistré comme "supérieur à" (>) la plus haute concentration.

6. Pour *Aspergillus* sp., lire la CMI comme la plus basse concentration avec une couleur bleue.

INTERPRETATION DES RESULTATS

TABLEAU 2. Illustration et interprétation des résultats des tests que l'on peut rencontrer

	Concentration de la cupule µg/ml						R = ROUGE : Indication positive de croissance	B = BLEU : Indication négative de croissance
	1	2	4	8	16	32		
A.	R	R	R	B	B	B	Modèle de croissance typique ; le point de virage de la CMI est à 8 µg/ml.	
B.	R	R	R	R	R	R	Croissance dans toutes les cupules ; le point de virage de la CMI est >32 µg/ml.	
C.	B	B	B	B	B	B	Aucune croissance dans aucune cupule ; le point de virage de la CMI est ≤1 µg/ml.	
D.	R	R	R	B	R	R	“Cupule sautée”. Le point de virage de la CMI est >32 µg/ml. Ne pas tenir compte du “saut” si les cupules ont une croissance des deux côtés. Si plusieurs “sauts” devaient se produire dans une colonne, les résultats du test seraient invalidés ¹	
E.	R	R	B	B	R	R	Double “cupule sautée”. Le test devra être répété ¹	

¹ Avec une technique soigneuse, ces événements sont rares.

NOTES DE LECTURE

Amphotéricine B. Pour l'amphotéricine B à 24 heures, les points de virage se définissent en général facilement et la CMI est lue comme la plus faible concentration en médicament empêchant tout changement de couleur discernable. On ne rencontre pas habituellement de points de virage diffus avec l'amphotéricine B.

La première cupule présentant un net changement de couleur par comparaison avec la cupule à croissance positive est la CMI.



Flucytosine et antifongiques Azole. *Candida albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* avec la flucytosine et les azoles, tels que le fluconazole, l'itraconazole, le kéroconazole, le voriconazole et le posaconazole peuvent donner des points de virage en général moins tranchants en raison de la croissance diffuse, et peuvent constituer une source significative de variabilité. La diffusion se caractérise par un léger changement de couleur, et elle est souvent identique pour toutes les concentrations du médicament supérieures à la CMI. La CMI devra être lue comme la première cupule montrant un virage moins intense comparé à la cupule de contrôle à croissance positive. Les souches de référence de la sensibilité définie peuvent également aider à former le personnel. Les isolats de *Candida krusei* sont supposés être intrinsèquement résistants au fluconazole, et leur CMI ne devra pas être interprétée, (1) un commentaire devra accompagner les résultats des tests rapportés.

Point de virage diffus : Caractérisé par un léger changement de couleur qui persiste, il est souvent identique pour plusieurs concentrations. La CMI devra être lue comme la

première cupule présentant un virage moins intense par comparaison avec la cupule de contrôle à croissance positive.



Échinocandines Les points limites de concentration minimale inhibitrice devraient être déterminés après 24 heures d'incubation à 35°C. La concentration minimale inhibitrice devrait être lue à la première cupule présentant un changement de couleur moins intense par comparaison avec la cupule de contrôle positive.



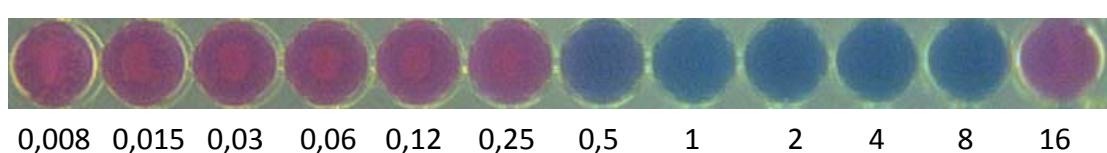
Itraconazole :

L'itraconazole peut occasionnellement se séparer de la solution à des concentrations $\geq 4 \mu\text{g/ml}$. La cupule affectée peut alors présenter une croissance et virer au rouge.



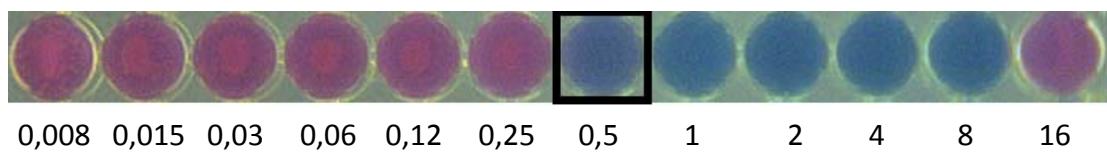
Nous constatons de temps à autre une croissance paradoxale aux concentrations d'itraconazole les plus élevées sur les panneaux pour levures Sensititre, ce qui se traduit par le virage au rose des puits.

Cet effet paradoxal, également connu sous le nom de phénomène d'Eagle, correspond à une observation dans laquelle l'augmentation de la concentration en antimicrobiens au-delà d'un certain point entraîne paradoxalement une augmentation du nombre de bactéries qui survivent. L'explication pourrait en être la suivante : comme la concentration est trop élevée, l'agent peut devenir le propre antagoniste du récepteur avec lequel il se lie (les protéines liant la pénicilline par exemple dans le cas d'une pénicilline).



Résolution

La croissance aux concentrations élevées doit être ignorée à moins que l'on ait une croissance à toutes les autres concentrations de l'itraconazole. Dans l'exemple ci-dessous, le puits à 0,5 $\mu\text{g/ml}$ signalé par le carré noir est celui où le résultat de CMI doit être enregistré.



Pour toute question ou en cas de doute, prière de prendre contact avec le service d'assistance technique au +441342318777 ou par courriel à l'adresse suivante : techsupport@trekds.co.uk.

On pourra également composer le +1-800-871-8909 ou envoyer un courrier électronique à techsupport@trekds.com aux États-Unis.

Contamination/Sauts

Autrement, une cupule rose (croissance) entre des cupules bleues (pas de croissance) pourrait indiquer une contamination. Il faut alors extraire une sous-culture du contenu de la cupule pour en déterminer la cause.

Une cupule bleue dans une série de cupules rouges (croissance) signifie qu'un "saut" a eu lieu et il ne faut pas en tenir compte. Pour la lecture de la CMI, on omettra toutes les cupules sautées. Si plus d'une cupule a été sautée, **il ne faut pas** rapporter les résultats pour l'antifongique.



CONTROLE QUALITE

La fréquence des tests de contrôle qualité devra être conforme aux directives locales (1). L'inoculum devra être cultivé sur un milieu adapté pour en vérifier la pureté. Les résultats des tests ne seront pas validés si une culture mélangée est détectée.

Toutes les plaques sensibles comprennent des cupules de contrôle positif. Les tests ne sont pas validés s'il n'y a pas une croissance distincte dans toutes les cupules de contrôle positif.

Pour le contrôle qualité utilisateur du système de CMI, les cultures suivantes de la collection américaine des cultures type (American Type Culture Collection, ATCC®) sont recommandées :

<i>Candida krusei</i> *	ATCC® 6258
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC® 22019

*L'ATCC liste maintenant ces organismes sous *Issatchenkovia orientalis*.

Les résultats ne devront **pas** être reportés si les résultats du contrôle qualité ne sont pas dans la plage acceptable.

Les valeurs de contrôle qualité attendues sont fournies dans le Tableau 3.

Contacter le distributeur de Sensititre® ou TREK Diagnostic Systems au cas où les divergences du contrôle qualité ne pourraient être résolues.

TABLEAU 3. Plages/ Fourchettes de la CMI recommandées à 24 et 48 heures pour les souches de contrôle qualité ($\mu\text{g/ml}$).

Les plages qui diffèrent ou additionnelles aux plages de contrôle qualité publiées sont soulignées (1).

Antifungal Agent	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258		<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	
	24 hour	48 hour	24 hour	48 hour
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>
5-Flucytosine	4 - 16	8 - 32	<u>0.12 - 0.5</u>	0.12 - 0.5
Itraconazole	0.12 - 1	0.25 - 1	0.12 - 0.5	0.12 - 0.5
Ketoconazole	0.12 - 1	0.25 - 1	0.03 - 0.25	0.06 - 0.5
Micafungin	<u>0.06 - 0.25</u>	0.12 - 0.5	0.5 - 2	0.5 - 4
Posaconazole	0.06 - 0.5	0.12 - 1	0.06 - 0.25	0.06 - 0.25
Voriconazole	0.06 - 0.5	0.12 - 1	0.015 - 0.12	0.03 - 0.25

TABLE 4. Critère d'interprétation de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) pour *Candida* sp. (CLSI M27)

Antifungal Agent	Susceptible	Susceptible dose dependent	Intermediate	Resistant	Non-susceptible
Anidulafungin	≤ 2				> 2
Caspofungin	≤ 2				> 2
Fluconazole*	≤ 8	16 - 32		≥ 64	
5-Flucytosine	≤ 4		8 - 16	≥ 32	
Itraconazole	≤ 0.125	0.25 - 0.5		≥ 1	
Micafungin	≤ 2				> 2
Voriconazole	≤ 1	2		≥ 4	

On suppose que les isolats de *Candida krusei* sont intrinsèquement résistants au fluconazole et leur CMI ne devrait pas être interprétée en utilisant ce barème.

Remarque 1 : les points critiques ($\mu\text{g/mL}$) pour *Candida spp.* par rapport aux agents indiqués sont proposés. Si les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont mesurées en utilisant un barème qui donne des résultats tombant entre deux catégories, la catégorie immédiatement supérieure est retenue. Ainsi, un isolat avec une CMI du fluconazole de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ serait classé dans la catégorie S-DD.

Veuillez vous rapporter au CLSI (1) pour obtenir davantage d'informations sur l'interprétation des résultats.

LIMITATIONS

1. Les plaques YeastOne Sensititre® sont destinées à être utilisées avec les levures non exigeantes dont *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Aspergillus sp.* et diverses levures à croissance rapide. Elles ne sont pas prévues pour les levures exigeantes ou à croissance lente telles que *Histoplasma* ou *Blastomyces*, ainsi que les champignons filamenteux.
2. La comparaison entre la plaque YeastOne Sensititre® à 24 heures et la méthode de référence CLSI à 48 heures a été évaluée. Cependant, en raison de la difficulté à corrélérer les points de virage des organismes diffus (*C. albicans*) à 48 heures d'incubation, des taux d'erreur élevés sont observés.
3. Les tests sur les champignons et les antifongiques sont par essence moins précis que les tests bactériologiques.
4. Certains chercheurs pensent que la lecture à 24 heures est plus appropriée que la lecture à 48 heures en raison du problème de diffusion de certains isolats. La norme CLSI officielle indique que les lectures devront être accomplies à 48 heures. Sous réserve qu'assez de données soient collectées et analysées, la question du délai de lecture le plus pertinent au plan clinique reste sans réponse. Le compte-rendu des résultats devra indiquer clairement les délais de lecture.
5. A titre de guide supplémentaire, il est conseillé d'étudier la norme CLSI M27 des sensibilités aux antifongiques.
6. Le changement de couleur est indicateur du point de virage, non de la turbidité. (Ce fait atténue certaines des principales inquiétudes liées à l'interprétation de certaines espèces de *Candida* en raison de la 'diffusion'. La diffusion s'observe plus couramment sur les isolats autres que sanguins et ceux d'autres fluides corporels stériles.)
7. Ne pas lire à 24 heures si la cupule de contrôle n'a pas complètement viré positive.
8. Les performances du voriconazole avec *Cryptococcus sp.* et les espèces de levures à croissance rapide n'ont pas été déterminées. La CMI du voriconazole ne devra par conséquent être reportée que pour *Candida sp.*
9. Utiliser exclusivement avec un milieu liquide d'inoculum de sensibilité des levures agréé Sensititre®. L'utilisation d'autres milieux liquides pourrait entraîner des erreurs.
10. Comme pour toute méthode de tests de sensibilité in-vitro, les résultats des tests devront être corrélés avec la sensibilité clinique du patient à la thérapie prescrite.
11. Les performances n'ont été établies que pour l'Amphotéricine B, l'Itraconazole, le Posaconazole et le Voriconazole sur des espèces *Aspergillus*.
12. La référence 5 a montré un seuil élevé (>99% de concordance) avec la méthode CLSI (NCCLS) pour l'amphotéricine B et *Aspergillus sp.* Une concordance inférieure a été constatée avec l'itraconazole, *A. fumigatus*, *A. flavus* et *A. terreus* ont obtenu >90% de concordance tandis que *A. nidulans* a obtenu 85% et *A. ustus* 33% sur des panneaux étuvés pendant 48 heures avec un inoculum de 10^3 cellules souches/ml. Une concordance de plus de 90% a été observée avec un inoculum de 10^4 cellules souches/ml et 72 heures d'incubation avec l'itraconazole et l'amphotéricine B (6).
13. La corrélation entre la CMI de la caspofungine et le résultat du traitement après utilisation de la caspofungine n'a pas été complètement établie. (9)

14. Les performances de YeastOne® avec l'anidulafungine, la caspofungine, et la micafungine vis-à-vis des espèces *Cryptococcus* et *Aspergillus*, et des espèces de levures à croissance rapide **autres que les espèces Candida**, n'ont pas été complètement établies. Les CMI de l'anidulafungine, de la caspofungine, et de la micafungine ne doivent donc être indiquées que pour les espèces *Candida*.

15. Les performances de YeastOne® avec Posaconazole vis-à-vis des espèces *Cryptococcus* n'ont pas été complètement établies.

16. Pour rapporter les résultats obtenus avec les produits Sensititre certifiés CE IVD et approuvés par la FDA, utiliser uniquement les instruments compatibles avec Sensititre, c'est-à-dire les instruments à simple visualisation à miroir, Sensitouch, Vizion, Sensititre Autoreader, Optiread et ARIS. Nul autre système ne sera accepté.

RÉSULTATS

Les panneaux sont soit lus manuellement, soit conçus pour donner des performances comparables à celles de la procédure de microdilution en milieu liquide de référence CLSI . Des résultats comparables se définissent comme $\geq 90\%$ de concordance dans la limite du doublement de la dilution de la CMI de référence (1).

Pour de plus amples informations, contacter TREK Diagnostic Systems ou le distributeur local.

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.
- (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., Holiday, 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. 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, posaconazole 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) Holiday, 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-Infroff, 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

CLAUSE DE NON RESPONSABILITÉ

Les informations contenues dans ce document technique sont valables au moment de l'impression et peuvent être modifiées sans notification préalable.

Veuillez contacter le distributeur TREK local pour les dernières mises à jour ou aller sur le site www.trekds.com/techinfo.



Fabriqué par TREK Diagnostic Systems
Units 17-19 Birches Industrial Estate, East Grinstead,
West Sussex, RH19 1XZ, Royaume-Uni
Tél : +44-1342-318777

Distribué par TREK Diagnostic Systems,
982 Keynote Circle, Suite 6, Cleveland, Ohio 44131
Service technique États-Unis : 1 (800) 642-7029



029-Yeast-ROW-IVD-F-V2.0
Date Updated: 6 August 2012

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

LOT	GB Batch code DE Chargenbezeichnung ES Código de lote IT Codice del lotto FR Code du lot GR Κωδικός παρτίδας LI serijos numeri. CZ Šarže kadex PL Kod Partii RO lot număr PT Código do grupo	
REF	GB Catalogue number DE Bestellnummer ES Número de catálogo IT Numero di catalogo FR Référence du catalogue GR Αριθμός καταλόγου LI Reikia žinoti plokštelės kodą CZ Katalogovho číslovka PL Numer Katalogu RO Catalog număr PT Número de catálogo	
	GB Manufacturer DE Hersteller ES Fabricante IT Fabbricante FR Fabricant GR Κατασκευαστής LI Dirbt CZ Výrobce PL Producent RO Manufacturer PT Fabricante	
	GB Consult Instructions for Use- DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consulte las instrucciones de uso IT Consultare le istruzioni per l'uso FR Consulter les instructions d'utilisation GR Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης LI Ieskant instrukciju CZ Projednat Instrukce Zauziti PL Przed użyciem zapoznaj się z instrukcją RO Consulta instrucțiuni pentru folos PT Consulte instruções para o uso	
	GB Temperature limitation DE Zulässiger Temperaturbereich ES Límite de temperatura IT Limiti di temperatura FR Limites de température GR Οπο θερμοκρασίας LI Temperatura reba CZ Teplota Limit PL Ograniczenie Temperatur RO Temperatură limitation PT Limitação de temperatura	
	GB Use By DE Verwendbar bis ES Fecha de caducidad IT Utilizzare entro FR Date de péremption GR Ημερομηνία λήξης LI Baigtis Data CZ Užití Za PL Użyć Do RO Folos By PT Uso perto	YYYYMMDD/YYYYYMM (MM=end of month) JJJJMMTT/JJJJmm (MM=Monatsende) aaaamddd/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/YYYYYMM (MM= fim do mês)
IVD	GB In Vitro Diagnostic Medical Device DE In Vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico in vitro IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro FR Dispositif médical de diagnostic in vitro GR Ιν νιτρο διαγνωστικό ιατρικό βοήθημα LI In vitro diagnostikai CZ In vitro diagnostic PL Urządzenie Diagnostyczne in vitro RO Pentru diagnosticare in vitro PT 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 ποσατητά 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
	GB Plates with fluorescence substrates in wells DE Platten mit Fluoreszenzsubstraten in den Mulden ES Placa con substratos fluorescentes en los pocillos IT Pannelli con substrati fluorescenti nei pozzetti FR Plaquette avec substrats fluorescents dans les cuves GR Πλάκα με υποστρώματα φθορισμού σε υποδοχές LI substrato plokštelės CZ Fluorescenční substráty PL Płytki z substratami fluorescencyjnymi w studzienkach RO Fluorescentă Substratul PT Placas com as carcaças da fluorescência nos poços

SYMBOLS_V2.0