

Kat. č.: 10010269

Pro mikrobiologii

Diagnostická souprava CANDIDA-Screen je určena pro screeningové rozlišení nejčastěji se vyskytujících klinicky významných druhů kvasinek. CANDIDA-Screen je umístěn v jamkách jednostrippové mikrotitrační destičky. Na jedné mikrotitrační destičce je možné provést 12 stanovení.

**Souprava CANDIDA-Screen obsahuje:**

- Jednostrippové mikrotitrační destičky se sušidlem, 3 ks
- Návod a kódová kniha (**Code book**)
- 3 PE sáčky pro inkubaci
- Sáček na uložení nespotebované destičky
- Barevná škála pro soupravu CANDIDA-Screen
- Formulář pro záznam výsledků
- Víčko

**Skladování, expirace:**

CANDIDA-Screen je třeba skladovat při teplotě (+2 až +8) °C. Expirace je vyznačena na každém balení.

**Bezpečnostní zásady:**

Souprava CANDIDA-Screen je určena pouze k profesionálnímu použití. Se soupravou je oprávněn pracovat jenom patřičně zaškolený pracovník ovládající zásady práce s infekčním materiálem a jeho bezpečnou likvidaci podle závazných směrnic pracoviště.

### Pracovní postup

**Potřeby pro práci se soupravou CANDIDA-Screen, které nejsou součástí soupravy:**

- Petriho misky se Sabouraud-glukózovým 2% agarem bez aditiv, krevním agarem, či jiným vhodným kultivačním médiem
- Parafinový olej sterilizovaný, kat.č. 10003371 - 40 stanovení
- Zkumavky (100x15 mm) se sterilním nepufrovaným fyziologickým roztokem
- Přístroj Densi-La-Meter II, kat. č. 50001529
- Vortex V1, kat. č. 50001715
- Krokovací pipeta Mikro-La-Stepper, kat. č. 50001707
- Termostat 25 - 30 °C
- Běžné laboratorní mikrobiologické vybavení (klíčky, popisovače, kahan)

**Izolace kultur:**

Izolace kultur se provádí standardní technikou na Sabouraud-glukózovém 2% agaru (bez aditiv), krevním agaru nebo jiném kultivačním médiu, jehož vhodnost byla ověřena na doporučených kontrolních kmenech.

**Příprava inokula:**

- Z čisté, dobře narostlé, 24 - 48 h kultury připravte v nepufrovaném sterilním fyziologickém roztoku mikrobiální suspenzi o hustotě zákalu 3 McF (pomocí vortexu suspenzi důkladně homogenizujte).

**Ověření čistoty inokula:**

- Pro ověření čistoty inokula proveďte stejnou klíčkou, jakou jste připravili suspenzi, roztěr na Sabouraud-glukózovém agaru (2%). Čistotu kultury kontrolujte po 24 hodinách inkubace. V případě slabého nárůstu kultury prodlužte inkubaci o dalších 24 hod.

**Příprava destičky CANDIDA-Screen:**

- Odstráňte stranu aluminiového sáčku a vyjměte destičku. Oddělte příslušný počet stripů mikrotitrační destičky. Stripy vložte do rámečku.
- Zbytek nepoužité destičky se sušidlem vložte do přiloženého ALU sáčku na uložení nezužitkované destičky a uložte při teplotě (+2 až +8) °C pro další použití; dbejte na to, aby destička byla chráněna před vlhkostí. Doporučujeme destičku po prvním použití spotřebovat do 4 týdnů. V případě, že se soupravami MIKROLATEST® pracujete poprvé a volný rámeček destičky nemáte k dispozici, použijte rámeček první destičky a zbývající stripy uložte ve skladovacím sáčku volně.

**Inokulace:**

- Inokulujte 100 µl suspenze ve fyziologickém roztoku do jamek stripů.
- Převrstvěte nainokulované jamky 3 – 4 kapkami parafinového oleje.

**Inkubace:**

- Vložte takto připravené mikrotitrační destičky do inkubačního PE sáčku a otevřený konec sáčku zahněte pod destičku tak, aby nedošlo k vysychání inokula.
- Inkubujte v termostatu, nastaveného na teplotu 25 - 30 °C po dobu 24 hodin.
- U pomalu rostoucích mikroorganismů jako např. *C. neoformans* je možné prodloužit inkubaci na celkovou dobu 24 – 48 hod.

**Hodnocení:**

- Po 24, případně 48 hodinách proveďte zhodnocení reakcí.
- V případě potřeby vyjměte destičku z inkubačního PE sáčku.
- Odečtěte všechny testy a výsledky zaznamenejte do formuláře na záznam výsledků.

**Poznámka:**

Pro hodnocení barevných reakcí použijte barevnou škálu a tabulku **Interpretace reakcí** nebo výsledky barevných reakcí kontrolních kmenů.

Pro vyhodnocení výsledku použijte kódovou knihu (**Code book**), která je v soupravě přiložena nebo vyhodnocovací software TNW 7.0.

**Dodatkové testy:**

Při dosažení nejednoznačného výsledku doporučujeme provést následující dodatkové testy:

**GET test (test tvorby klíčnicích vaků)**

- Inokulujte kolonie kvasinek do 1 ml lidského nebo zvířecího séra (hustota inokula 0,5-1 McF).
- Umístěte do termostatu na 3 h při 35 – 37 °C.
- Pozorujte klíčnicí vaky pod mikroskopem (100x). Klíčnicí vaky rodu *Candida* rostou ve vláknité formě. Při odečítání výsledků po inkubaci přes noc, již není tvorba klíčnicích vaků ve vláknité formě pro rod *Candida* specifická (pozitivní výsledek testu pro druhy uvedené v Identifikační tabulce odpovídá pouze *C. albicans*).

**PSH - Pseudomycelium**

Kritériem pro rod *Candida* je tvorba pseudomycelia na nutričně chudých substrátech.

- Podle návodu k použití od dodavatele, nebo standardního postupu připravte agar z rýžového extraktu.
- Inokulujte kvasinky na rýžový agar nalitý do tenké vrstvy a překryjte krycím sklíčkem.
- Umístěte max. na 4 dny do termostatu při 25 – 30 °C a po každém jednom dni kontrolujte nárůst biomasy pod mikroskopem (100x).

**Vyhodnocení:** Pseudomycelium tvořené pseudohyfy s terminálními chlamydospórami (silnostěnné kulovité nevyvíjející se útvary, které mohou vznikat na pseudomyceliu), je charakteristické pro *C. albicans* a *C. dubliniensis*. Většina ostatních druhů rodu *Candida* tvoří pseudomycelium bez chlamydospór. Některé druhy kvasinek však pseudomycelium netvoří.

**HYP – Tvorba pravých hyf**

Kritériem pro zařazení do rodů *Geotrichum* a *Trichosporon* je tvorba pravých hyf a arthrokonidií. Arthrokonidie vznikají fragmentací terminálních částí hyf.

**Interpretace reakcí:**

Sloupec	Test	Zkrat. testu	Reakce:	pozitivní	negativní
H	Ureáza	URE		červená, červenooranžová	žlutá, světle oranžová
G	Sacharóza	SUC		žlutá, žlutozelená	zelená
F	Maltóza	MLT		žlutá, žlutozelená	zelená
E	Laktóza	LAC		žlutá, žlutozelená	zelená
D	Galaktóza	GAL		žlutá, žlutozelená	zelená
C	Trehalóza	TRE		žlutá, žlutozelená	zelená
B	Celobióza	CEL		žlutá, žlutozelená	zelená
A	Prolin	PRO		žlutá, nažloutlá	bezbarvá

**Vlastnosti soupravy:**

Souprava byla testována na souboru 60 kmenů. 50 kmenů bylo správně identifikováno (83,3%).

**Nejčastější možné příčiny neúspěchu při identifikaci:**

- Smíšená nebo kontaminovaná kultura: pracujte s čistou kulturou izolovanou z doporučených kultivačních médií. Kultura by měla být stará 24 hodin, případně 48 hodin u pomaleji rostoucích kvasinek.
- Použití inokula malé hustoty nebo malého objemu. Dodržujte hustotu inokula McFarland 3. Dbejte na homogenitu inokula.
- Inokulum bylo roztříknuto do sousední řady, připravované pro další testovanou kulturu.
- Nedodržení některého bodu z doporučeného pracovního postupu.
- Může se jednat o atypický kmen, nebo zástupce druhu, nebo příbuzného rodu, který není uveden v Seznamu taxonů

**Likvidace použitého materiálu:**

Použitý panel vložte do nádoby pro infekční materiál nebo zničte autoklávováním nebo spálením.

**Kontrola kvality soupravy CANDIDA-Screen:**

Pro účely interní kontroly kvality soupravy jsou doporučovány následující kontrolní kmeny:

**Candida albicans CCM 8261 (ATCC 90028)**

**Cryptococcus neoformans CCM 8312 (ATCC 90112)**

**Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae CCM 5852 (ATCC 13882)**

Tyto kmeny dodává:

Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita, Tvrďého 14, 602 00 Brno, Telefon: 549 49 1430, Fax: 543 247 339; 541 211 214, E-mail: ccm@sci.muni.cz.

Kmeny jsou dodávány v lyofilizovaném stavu nebo na želatinových discích.

Upozornění:

Na kontrolu funkčnosti soupravy je nutné použít vždy čerstvé izoláty kmenů CCM. Tyto kmeny slouží pro kontrolu funkčnosti biochemických reakcí, nikoli pro kontrolu správnosti, či úspěšnosti identifikace.

Datum poslední revize: 14.3.2011

**Kontrolní kmeny:**

Řádek	H	G	F	E	D	C	B	A
<b>Candida albicans CCM 8261</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	-	+	+	-	+	d	-	+
<b>Cryptococcus neoformans CCM 8312</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Klebsiella pneumoniae CCM 5852</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	-	+	+	+	+	+	+	-

**Vysvětlivky:**

+ = pozitivní reakce

- = negativní reakce

d = variabilní reakce

**Diferenční tabulka:**

Taxon	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
Candida albicans	-	+	+	-	+	+	-	+
Candida glabrata	-	-	-	-	-	+	-	-
Candida guilliermondii	-	+	-	-	+	d	(-)	+
Candida kefyr	-	+	-	(+)	+	-	d	-
Candida krusei	-	-	-	-	(-)	-	-	(-)
Candida lipolytica	(+)	-	-	-	(-)	-	-	+
Candida lusitaniae	-	+	(+)	-	d	d	+	+
Candida parapsilosis	-	+	d	-	+	d	-	+
Candida tropicalis	-	+	+	-	+	+	-	-
Cryptococcus neoformans	+	d	(-)	-	d	(-)	(-)	-
Geotrichum sp.	-	-	-	-	d	-	-	(-)
Saccharomyces cerevisiae	-	+	(+)	-	d	d	-	-
Trichosporon sp.	(+)	-	-	-	-	-	-	(-)

**Vysvětlivky:** + = pozitivní reakce - = negativní reakce d = variabilní reakce (+) = většinou pozitivní reakce (-) = většinou negativní reakce

Kat. č.: 10010269

Pre mikrobiológiu

Diagnostická súprava CANDIDA-Screen je určená pre screeningové rozlíšenie niektorých najčastejšie sa vyskytujúcich klinicky významných druhov kvasiniek. CANDIDA-Screen je umiestnený v jamkách jednostripovej mikrotitračnej doštičky. Na jednej mikrotitračnej doštičke je možno vykonať 12 stanovení.

**Súprava CANDIDA-Screen obsahuje:**

- Jednostripové mikrotitračné doštičky so sušidlom, 3 ks
- Návod na použitie a kódová kniha (**Code book**)
- 3 PE vrecúška pre inkubáciu
- Vrecúško na uloženie nespotrebovanej doštičky
- Farebná škála pre súpravu Candida-Screen
- Formulár pre záznam výsledkov
- Viečko

**Skladovanie, expirácia:**

CANDIDA-Screen skladujte pri teplote (+2 až +8)° C. Exspirácia je vyznačená na každom balení.

**Upozornenie:**

- Súprava je určená iba k profesionálnemu použitiu. So súpravou je oprávnený pracovať len patrične zaškolený pracovník ovládajúci zásady práce s infekčným materiálom a jeho bezpečnú likvidáciu podľa záväzných smerníc pracoviska.

**Pracovný postup****Potreby pre prácu so súpravou CANDIDA-Screen (nie sú súčasťou súpravy):**

- Petriho misky so Sabouraud-glukózovým 2% agarom bez aditív, krvným agarom, či iným vhodným kultivačným médiom
- Parafínový olej sterilizovaný, kat.č. 10003371 - 40 stanovení
- Skúmavky (100x15 mm) so sterilným nepufrovaným fyziologickým roztokom
- Prístroj Densi-La-Meter II, kat. č. 50001529
- Vortex V1, kat. č. 50001715
- Krokovacia pipeta Mikro-La-Stepper, kat. č. 50001707
- Termostat 25 - 30° C
- Bežné laboratórne mikrobiologické vybavenie (kľučky, popisovače, kahan)

**Izolácia kultúry:**

Izolácia kultúr sa vykonáva štandardnou technikou na Sabouraud-glukózovom 2% agare (bez aditív), krvnom agare alebo inom kultivačnom médiu, ktorého vhodnosť bola overená na doporučených kontrolných kmeňoch.

**Príprava inokula:**

- Z čistej, dobre narastenej, 24 - 48 h kultúry pripravte v nepufrovanom sterilnom fyziologickom roztoku mikrobiálnu suspenziu s hustotou zákalu 3 McF (pomocou vortexu suspenziu dôkladne homogenizujte).

**Overenie čistoty inokula:**

- Pre overenie čistoty inokula vykonajte rovnakú kľučku, ktorou ste pripravili suspenziu, rozter na Sabouraud-glukózovom agare (2%). Čistotu kultúry kontrolujte po 24 hodinách inkubácie. V prípade slabého nárastu kultúry predĺžte inkubáciu o ďalších 24 hod.

**Príprava doštičky CANDIDA-Screen:**

- Odstrihnite stranu alumíniového vrecúška a vyberte doštičku. Oddel'te príslušný počet stripov mikrotitračnej doštičky. Stripy vložte do rámčeka.
- Zvyšok nepoužitej doštičky so sušidlom vložte do priloženého Alu vrecúška na uloženie nezužitkovanej doštičky a uložte pri teplote (+2 až + 8)° C pre ďalšie použitie; dbajte na to, aby bola doštička chránená pred vlhkosťou. Doporučujeme doštičku po prvom použití spotrebovať do 4 týždňov. V prípade, že so súpravami MIKROLATEST® pracujete po prvýkrát a voľný rámček doštičky nemáte k dispozícii, použite rámček prvej doštičky a zvyšné stripy uložte v skladovacom vrecúšku voľne.

**Inokulácia:**

- Inokulujte 100 µl suspenzie vo fyziologickom roztoku do jamiek stripu.
- Prevrstevte nainokulované jamky 3 – 4 kvapkami parafínového oleja.

**Inkubácia:**

- Vložte takto pripravené mikrotitračné doštičky do inkubačného PE vrecúška a otvorený koniec vrecúška zahňte pod doštičku tak, aby nedošlo k vyschnutiu inokula.
- Inkubujte v termostate nastavenom na teplotu 25 - 30°C po dobu 24 hodín.
- V prípade pomaly rastúcich mikroorganizmov ako napr. *C. neoformans* je možné predĺžiť inkubáciu na celkovú dobu 24 – 48 hod.

**Hodnotenie:**

- Po 24, prípadne 48 hodinách, zhodnoťte reakcie.
- V prípade potreby vyberte doštičku z inkubačného PE vrecúška.
- Odčítajte všetky testy a výsledky zaznamenajte do formuláru na záznam výsledkov.

**Poznámka:**

Pre hodnotenie farebných reakcií použite farebnú škálu a tabuľku **Interpretácia reakcií** alebo výsledky farebných reakcií kontrolných kmeňov. Pre vyhodnotenie výsledku použite kódovú knihu (**Code book**), ktorá je priložená v súprave, alebo vyhodnocovací software TNW 7.0.

**Dodatkové testy:**

Pri identifikácii kvasiniek pomocou identifikačnej tabuľky môže dôjsť k dosiahnutiu nejednoznačného výsledku. Doporučujeme vykonať nasledujúce dodatkové testy:

**GET test (test tvorby kľúčnych vakov)**

- Inokulujte kolónie kvasiniek do 1 ml ľudského alebo zvieracieho séra (hustota inokula 0,5-1 McF)
- Umiestnite do termostatu na 3 h pri 35–37 °C.
- Pozorujte kľúčne vaky pod mikroskopom (100x). Kľúčne vaky rodu *Candida* rastú vo vláknitej forme. Pri odčítaní výsledkov po inkubácii cez noc nie je už tvorba kľúčnych vakov vo vláknitej forme pre rod *Candida* špecifická (Pozitívny výsledok testu pre druhy uvedené v identifikačnej tabuľke zodpovedajú iba *C. albicans*).

**PSH - Pseudomycélium**

Kritériom pre rod *Candida* je tvorba pseudomycélia na nutrične chudobných substrátoch.

- Pripravte agar z ryžového extraktu podľa návodu k použitiu od dodávateľa alebo štandardným postupom.
- Inokulujte kvasinky na ryžový agar naliaty do tenkej vrstvy a prekryte krycím sklíčkom.
- Umiestnite max. na 4 dni do termostatu pri 25–30 °C a po každom jednom dni kontrolujte nárast biomasy pod mikroskopom (100x).

**Vyhodnotenie:** Pseudomycélium tvorené pseudohyfmami s terminálnymi chlamidospórmi (tlstostenné guľovité nevyvíjajúce sa útvary, ktoré môžu vzniknúť na pseudomycéliu) je charakteristické pre *C. albicans* a *C. dubliniensis*. Väčšina ostatných druhov rodu *Candida* tvorí pseudomycélium bez chlamydozspór. Niektoré druhy kvasiniek však pseudomycélium netvorí.

**HYP – Tvorba pravých hyf**

Kritériom pre rod *Geotrichum* a *Trichosporon* je tvorba pravých hyf a arthrokonidií. Arthrokonídie vznikajú fragmentáciou terminálnych častí hyf.

**Interpretácia reakcií:**

Stípec	Test	Skrat. testu	Reakcia:	pozitívna	negatívna
H	Ureáza	URE		červená, červenooranžová	žltá, svetlo oranžová
G	Sacharóza	SUC		žltá, žltozelená	zelená
F	Maltóza	MLT		žltá, žltozelená	zelená
E	Laktóza	LAC		žltá, žltozelená	zelená
D	Galaktóza	GAL		žltá, žltozelená	zelená
C	Trehalóza	TRE		žltá, žltozelená	zelená
B	Celobióza	CEL		žltá, žltozelená	zelená
A	Prolin	PRO		žltá, nažltá	bezfarebná

**Vlastnosti súpravy:**

Súprava bola testovaná na súbore 60 kmeňov. 50 kmeňov bolo správne identifikovaných (83,3%).

**Najčastejšie možné príčiny neúspechu pri identifikácii:**

- Zmiešaná alebo kontaminovaná kultúra: pracujte s čistou kultúrou izolovanou z doporučených kultivačných médií. Kultúra by mala byť stará 24 hodín, prípadne 48 hodín u pomalšie rastúcich kvasiniek.
- Použitie inokula malej hustoty alebo malého objemu. Dodržujte hustotu inokula McFarland 3. Dbajte na homogenitu inokula.
- Inokulum bolo nastriekané do susedného riadku, pripravovaného pre ďalšiu testovanú kultúru.
- Nedodržanie niektorého bodu z doporučeného pracovného postupu.
- Môže sa jednať o atypický kmeň alebo zástupcu druhu alebo príbuzného rodu, ktorý nie je uvedený v Zozname taxónov.

**Likvidácia použitého materiálu:**

Použitý panel vložte do nádoby pre infekčný materiál alebo zlikvidujte autoklávaním alebo spálením.

**Kontrola kvality súpravy CANDIDA-Screen:**

Pre účely internej kontroly kvality súpravy sú doporučené nasledujúce kontrolné kmene:

**Candida albicans CCM 8261 (ATCC 90028)**

**Cryptococcus neoformans CCM 8312 (ATCC 90112)**

**Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae CCM 5852 (ATCC 13882)**

Tieto kmene dodáva Česká sbírka mikroorganizmů, Masarykova univerzita, Tvrdého 14, 602 00 Brno, CZ Telefon: 549 49 1430, Fax: 543 247 339; 541 211 214, E-mail: ccm@sci.muni.cz. Kmene sú dodávané v lyofilizovanom stave alebo na želatínových diskoch.

Upozornenie:

Pre kontrolu funkčnosti súpravy je nutné použiť vždy čerstvé izoláty kmeňov CCM. Tieto kmene slúžia pre kontrolu funkčnosti biochemických reakcií, nie však pre kontrolu správnosti či úspešnosti identifikácie.

Dátum poslednej revízie: 14.3.2011

**Kontrolné kmene:**

Riadok	H	G	F	E	D	C	B	A
<b>Candida albicans CCM 8261</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	-	+	+	-	+	d	-	+
<b>Cryptococcus neoformans CCM 8312</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Klebsiella pneumoniae CCM 5852</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	-	+	+	+	+	+	+	-

**Vysvetlivky:**

+ = pozitívna reakcia

- = negatívna reakcia

d = variabilna reakcia

**Diferenciačná tabuľka:**

Taxon	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
Candida albicans	-	+	+	-	+	+	-	+
Candida glabrata	-	-	-	-	-	+	-	-
Candida guilliermondii	-	+	-	-	+	d	(-)	+
Candida kefyr	-	+	-	(+)	+	-	d	-
Candida krusei	-	-	-	-	(-)	-	-	(-)
Candida lipolytica	(+)	-	-	-	(-)	-	-	+
Candida lusitanae	-	+	(+)	-	d	d	+	+
Candida parapsilosis	-	+	d	-	+	d	-	+
Candida tropicalis	-	+	+	-	+	+	-	-
Cryptococcus neoformans	+	d	(-)	-	d	(-)	(-)	-
Geotrichum sp.	-	-	-	-	d	-	-	(-)
Saccharomyces cerevisiae	-	+	(+)	-	d	d	-	-
Trichosporon sp.	(+)	-	-	-	-	-	-	(-)

**Vysvetlivky:** + = pozitívna reakcia - = negatívna reakcia d = variabilna reakcia (+) = väčšinou pozitívna reakcia (-) = väčšinou negatívna reakcia

Cat. No.: 10010269

For microbiology

The diagnostic kit CANDIDA-Screen is designed to screen the most frequent clinically significant yeast species. CANDIDA-Screen is placed in wells of a one-strip microtitration plate. It is possible to carry out 12 identification on a plate.

**CANDIDA-Screen kit contains:**

- One-strip microtitration plates with desiccant, 3 pc
- Instructions for use including **Code book**
- Three PE bags for incubation
- A storage bag for unused plate
- Colour scale for CANDIDA-Screen kit
- Record form
- Lid

**Storage, expiration:**

CANDIDA-Screen should be stored at (+2 to+8)° C. Date of expiry is indicated on each package.

**Safety rules:**

The CANDIDA-Screen kit is for professional use only. Only a trained person should work with the kit. This person should follow safety rules for work with infectious material and for safe disposal according to the guidelines of the workplace.

**Recommended instructions for use of CANDIDA-Screen****Material required to perform a test (not included in the kit):**

- Petri dishes with the cultivation medium Sabouraud-dextrose agar 2% without additives, Columbia blood agar or another suitable non-selective cultivation medium.
- Paraffin oil sterilised (Cat. No. 10003371 - 40 determinations)
- Tubes (100x15 mm) with sterile unbuffered physiological solution
- Instrument Densi-La-Meter II (Cat. No. 50001529)
- Vortex V1( Cat. No. 50001715)
- Multistep pipette Mikro-La-Stepper (Cat. No. 50001707)
- Incubator 25 - 30 °C
- Common microbiological laboratory equipment (loops, burners, markers)

**Isolation of cultures:**

- The isolation of culture should be carried out by usual techniques on Sabouraud-Dextrose 2% agar (without additives) or blood agar. Another suitable culture medium can be used after it was tested on recommended control strains.

**Preparation of inoculum:**

Prepare microbial suspension from pure well grown 24 hour (48 hours for slowly growing yeast) culture in unbuffered sterile physiological solution. The suspension must have turbidity equal to McFarland 3. Use vortex to homogenise the suspension well.

**Purity control:**

- Confirm purity of the suspension by inoculation of the yeast suspension on Sabouraud-Dextrose agar (2%) using the same loop as in the preparation of the inoculum. Incubate it for 24 hours. Check the purity of the culture after 24 hours. Incubate for another 24 hours if the growth is weak.

**Preparation of CANDIDA-Screen plate:**

- Cut off one side of aluminium packaging foil and remove the plate from the package. Separate required number of strips of microtitration plate. Remove the adhesive tape from individual strips and insert them into prepared frame. In case you work with MIKROLATEST® kit for the first time and an empty frame is not available, use the frame of the first plate. The unused strips of the first plate put into the storage bag freely.
- Insert any unused strips into enclosed aluminium bag with desiccant and store it at the temperature (+2 to +8)° C for further use. Protect it against the moisture. We recommend to use the plate before the 4th week of its opening.

**Inoculation:**

- Inoculate 100 µl of the suspension in the physiological solution into the wells of a strip.
- Add 3-4 drops of paraffin oil into inoculated wells.

**Incubation:**

- Insert the inoculated microtitration plate into an incubation PE bag and fold the open end of the bag under the plate to prevent drying of the inoculum.
- Incubate the Candida-Screen plate in an incubator set up for 25 - 30°C for 24 hours.
- It is possible to extend the incubation for slowly growing organisms such as *C. neoformans* for further 24 hours.

**Reading:**

- Evaluate reactions after 24 hours (eventually after 48 hours).
- Remove the plate from the incubation bag if necessary.
- Read all the reactions and record the results in the report sheets.

**Note:** Read the reactions according to the Colour scale or the table **Interpretation of the reactions** or according to the colour reactions of the control strains. For evaluation use **Code book** included in the Instruction or use software TNW. 7.0.

**Additional tests:**

The identification of the yeasts according to the **Differentiation table** can give indefinite results in some cases. We recommend to perform the following additional tests:

**GET - Germ tubes test**

- Inoculate yeast colonies in 1.0 ml of human or animal serum (density 0.5-1 McF)
- Place it in an incubator at 35–37 °C for 3 hours.
- Observe formation of germ tubes under microscope (magnification 100x). Germ tubes of genus *Candida* grow in filamentous form. The formation of filamentous form of germ tubes is not specific for the genus *Candida* after an overnight incubation. A positive result of the test for the species included in the **Differentiation table** applies to *C. albicans* only

**PSH - Pseudohyphes**

A characteristic for genus *Candida* is detection of pseudomycelium which will be formed in the presence of nutritionally poor substrates.

- Prepare rice extract agar according to the instructions for use of a supplier or a standard microbiology protocol.
- Inoculate a yeast strain onto a thin rice agar plate and cover with a cover slip.
- Place it in an incubator at 25–30 °C for 4 days. Observe a biomass growth under a microscope (magnification 100x) every day.

**Evaluation:** Pseudomycelium consisting of pseudohyphes with terminal chlamydo spores (spores with a spherical shape and a refractive cell wall) is indicative for *Candida albicans*. Most of other *Candida* sp. form pseudomycelium consisting of pseudohyphes without chlamydo spores. However some species don't form pseudohyphes.

**HYP - Formation of true hyphae**

A characteristic of genus *Geotrichum* and *Trichosporon* is formation of true hyphae and arthrospores. Arthrospores are formed by the fragmentation of the terminal parts of the hyphae.

**Interpretation of the reactions:**

Column	Test	Abbreviation	Reaction: positive	negative
H	Urease	URE	red, red-to-orange	yellow, light orange
G	Sucrose	SUC	yellow, yellow-to-green	green
F	Maltose	MLT	yellow, yellow-to-green	green
E	Lactose	LAC	yellow, yellow-to-green	green
D	Galactose	GAL	yellow, yellow-to-green	green
C	Trehalose	TRE	yellow, yellow-to-green	green
B	Celobiose	CEL	yellow, yellow-to-green	green
A	Proline	PRO	yellow, yellowish	colourless

**Kit characteristics:**

The kit was tested on a set of 60 strains. The CANDIDA-Screen identified 50 strains correctly (83.3%).

**The most frequent causes of identification failure:**

- Contaminated culture: work with pure cultures isolated from recommended culture media. Culture should be 24 hours old (48 hours for slowly growing species).
- Used inoculum was of low density or small volume. Please follow the correct McFarland 3 density of the suspension. Pay attention to the homogeneity of the inoculum.
- Inoculum has contaminated adjacent strips.
- Failure to observe some of the steps in the recommended procedure.
- There may be an atypical strain or a species not included in the Taxa list.

**Disposal of used material:**

Insert used strips into a container for infectious material and autoclave it or incinerate it.

**Quality control of CANDIDA-Screen kit:**

The following strains are recommended for internal quality control:

**Candida albicans CCM 8261 (ATCC 90028)**

**Cryptococcus neoformans CCM 8312 (ATCC 90112)**

**Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae CCM 5852 (ATCC 13882)**

These strains are supplied by the Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Tvrđého 14, 602 00 Brno, Czech Republic,

Phone: +420 549 49 1430, Fax: +420 543 247 339; 541 211 214, E-mail: ccm@sci.muni.cz. The strains are supplied lyophilised or on gelatin discs.

Caution:

It is necessary to use fresh isolates of the CCM strains each time when a kit is tested for its functionality. These strains are recommended to check the functionality of the kit and not to monitor accuracy or effect of the identification.

Date of last revision: 14.3.2011

**Control strains:**

Row	H	G	F	E	D	C	B	A
<b>Candida albicans CCM 8261</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	-	+	+	-	+	v	-	+
<b>Cryptococcus neoformans CCM 8312</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Klebsiella pneumoniae CCM 5852</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	-	+	+	+	+	+	+	-

**Explanations:**

- + = positive reaction
- = negative reaction
- v = variable reaction

**Differentiation table:**

Taxon	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
Candida albicans	-	+	+	-	+	+	-	+
Candida glabrata	-	-	-	-	-	+	-	-
Candida guilliermondii	-	+	-	-	+	v	(-)	+
Candida kefyr	-	+	-	(+)	+	-	v	-
Candida krusei	-	-	-	-	(-)	-	-	(-)
Candida lipolytica	(+)	-	-	-	(-)	-	-	+
Candida lusitanae	-	+	(+)	-	v	v	+	+
Candida parapsilosis	-	+	v	-	+	v	-	+
Candida tropicalis	-	+	+	-	+	+	-	-
Cryptococcus neoformans	+	v	(-)	-	v	(-)	(-)	-
Geotrichum sp.	-	-	-	-	v	-	-	(-)
Saccharomyces cerevisiae	-	+	(+)	-	v	v	-	-
Trichosporon sp.	(+)	-	-	-	-	-	-	(-)

Explanations: + = positive reaction - = negative reaction v = variable reaction (+) = mostly positive reaction (-) = mostly negative reaction



Nr kat.: 10010269

Do celów mikrobiologicznych

Zestaw diagnostyczny CANDIDA-Screen przeznaczony jest do przesiewowego różnicowania najczęstszych klinicznie istotnych gatunków grzybów drożdżopodobnych. CANDIDA-Screen znajduje się w studzienkach dzielonej na pojedyncze paski mikro płytki. Za pomocą jednej mikro płytki można przeprowadzić 12 oznaczeń.

**Zestaw CANDIDAScreen zawiera:**

- Mikro płytki dzielone na pojedyncze paski z pochłaniaczem wilgoci, 3szt.
- Instrukcję obsługi i książkę kodów
- 3 PE torebki do inkubacji
- Torebkę przeznaczoną do ułożenia niezużytej płytki
- Porównawczą skalę barw dla zestawu CANDIDA-Screen
- Formularze do wpisywania wyników
- Pokrywę

**Przechowywanie, termin ważności:**

CANDIDA-Screen należy przechowywać w temperaturze (od +2 do +8) °C. Data ważności podana jest na każdym opakowaniu.

**Zasady bezpieczeństwa:**

Zestaw CANDIDA-Screen przeznaczony jest wyłącznie do profesjonalnego zastosowania. Do pracy z zestawem upoważniony jest wyłącznie odpowiednio przeszkolony pracownik znający zasady pracy z materiałem zakaźnym oraz jego bezpiecznym usuwaniem zgodnie z obowiązującymi w miejscu pracy wytycznymi.

### Sposób postępowania

**Materiały potrzebne do pracy z zestawem CANDIDA-Screen, które nie są częścią zestawu:**

- Płytki Petriego z Sabouraud-glukozowym 2% agarom bez dodatków, agarom krwawym, lub innym odpowiednim podłożem hodowlanym
- Parafinowy olej sterylizowany, nr kat. 10003371 – 40 ozn./op.
- Probówki (100x15mm) zawierające sterylizowany niebuforowany roztwór soli fizjologicznej
- Urządzenie Densi-La-Meter II, nr kat. 50001529
- Vortex V1, nr kat. 50001715
- Krokowa pipeta Mikro-La-Stepper, nr kat. 50001707
- Ciepłarka 25 - 30°C
- Podstawowy mikrobiologiczny sprzęt laboratoryjny (ezy, markery, palnik)

**Izolowanie kultury:**

Izolowanie kultur należy przeprowadzić w sposób standardowy na Sabouraud-glukozowym 2% agarze (bez dodatków), agarze krwawym lub innym podłożu hodowlanym, którego stosowność została zweryfikowana za pomocą zalecanych szczepów kontrolnych.

**Przygotowanie inokulum:**

- Z czystej, dobrze wyrośniętej 24 - 48 godzinnej kultury przygotować w niebuforowanym sterylnym roztworze soli mikrobiałej zawiesinę o gęstości 3 McFarlanda (zawiesinę należy dokładnie zhomogenizować za pomocą vortexu)

**Sprawdzenie czystości inokulum:**

- W celu sprawdzenia czystości inokulum należy przeprowadzić tą samą ezą, którą przygotowano zawiesinę, wysiew kontrolny na Sabouraud-glukozowym agarze (2%). Czystość kultury należy sprawdzać po upływie 24 godzin inkubacji. W przypadku słabego wzrostu kultury należy przedłużyć czas inkubacji o kolejne 24 godziny.

**Przygotowanie płytki CANDIDA-Screen:**

- Odciać boczną krawędź aluminiowej torebki i wyjąć płytkę. Oddzielić odpowiednią ilość pasków mikro płytki. W przypadku pracy z zestawem MIKROLATEST® po raz pierwszy i niedysponowaniem wolną ramką, należy wyjąć niezużyte studzienki z pierwszej pełnej ramki, ułożyć luzem w torebce do przechowywania a ramkę tej pierwszej płytki wykorzystać do inkubacji.
- Resztę niezużytej płytki z pochłaniaczem wilgoci należy włożyć do torebki przeznaczonej do ułożenia niezużytej płytki, następnie przechowywać w temperaturze (od +2 do +8) °C do następnego zastosowania. Należy zadbać, żeby płytka była chroniona przed wilgocią. Zaleca się wykorzystanie płytki do 4 tygodni od pierwszego użycia.

**Inokulacja:**

- Inokulować 100 µl zawiesiny w roztworze soli fizjologicznej do każdej studzienki paska.
- Zakropić zainokulowane studzienki 3-4 kroplami sterylnego oleju parafinowego każdą.

**Inkubacja:**

- Włożyć tak przygotowane mikro płytki do PE torebki do inkubacji, otwarty koniec PE torebki zgiąć pod płytkę, żeby zapobiec wysychaniu inokulum.
- Inkubować w ciepłarce w temperaturze 25 - 30°C przez 24 godziny.
- W przypadku wolniej rosnących mikroorganizmów jak np. *C. neoformans* można przedłużyć inkubację na łączny czas 24-48 godzin.

**Ocena:**

- Po upływie 24, ewentualnie 48 godzin należy przeprowadzić ocenę reakcji.
- W razie potrzeby można wyjąć płytkę z PE torebki do inkubacji.
- Odczytać wszystkie testy, wyniki należy wpisać do formularzy do wpisywania wyników.

**Uwaga:**

Do oceny reakcji barwnych należy zastosować porównawczą skalę barw dla CANDIDA-Screen, tabelkę **Interpretacja reakcji**, lub należy orientować się wg reakcji barwnych szczepów kontrolnych.

Do oceny wyniku zastosować książkę kodów (**Code Book**), która wchodzi w skład zestawu lub program identyfikacyjny TNW 6,5.

**Testy dodatkowe:**

Podczas identyfikacji grzybów drożdżopodobnych za pomocą tabeli identyfikacyjnej można otrzymać niejednoznaczny wynik. W takim przypadku zaleca się przeprowadzenie następujących testów dodatkowych:

**GET – Germ tube test (test filamentacji)**

- Inokulować kolonie grzybów drożdżopodobnych do 1 ml ludzkiej lub zwierzęcej surowicy (gęstość inokulum 0,5-1 McF).
- Włożyć do ciepłarki na 3 godziny w temp. 35 – 37°C.

Obserwować worki nasienne pod mikroskopem (100x). Worki nasienne rodzaju *Candida* rosną w formie nici. Podczas odczytu wyników po inkubacji przez noc, wytwarzanie worków nasiennych w formie nici dla rodzaju *Candida* nie jest już specyficzne (Wynik dodatni testu dla gatunków wymienionych w tabeli identyfikacyjnej odpowiada tylko *C. albicans*).

**PSH – Pseudohyphes (pseudostrzępki)**

Kryterium dla rodzaju *Candida* jest wytwarzanie pseudomycelium na odżywczo słabych substratach.

- Należy przygotować podłoże z ekstraktu z ryżu według instrukcji obsługi otrzymanej od dostawcy, lub według standardowego sposobu postępowania.
- Inokulować grzyby drożdżopodobne na podłoże z ryżem rozlane do cienkiej warstwy i nakryć szkiełkiem.
- Włożyć do ciepłarki maksymalnie na 4 dni do temp. 25 – 30°C, po każdym dniu należy kontrolować wzrost biomasy pod mikroskopem (100x).

**Ocena:** Pseudomycelium, które tworzy pseudostrzępki wraz z terminalnymi chlamidosporami (w kształcie kuli, grubościennie, nie rozwijające się zarodniki, które mogą powstawać na pseudomycelium), jest charakterystyczne dla *C. albicans* a *C. dubliniensis*. Większość pozostałych gatunków rodzaju *Candida* wytwarza pseudomycelium bez chlamidospor. Niektóre gatunki grzybów drożdżopodobnych jednak nie wytwarzają pseudomycelium.

**HYP – Formation of true hyphae (wytwarzanie prawdziwej strzępki)**

Kryterium dla rodzaju *Geotrichum* oraz *Trichosporon* jest wytwarzanie prawdziwych strzępek i artronidii. Artronidie powstają poprzez fragmentację terminalnych części strzępek.

**Interpretacja reakcji:**

Kolumna	Test	Skrót testu	Reakcja: dodatnia	ujemna
H	Ureaza	URE	Czerwona, czerwono-pomarańczowa	Żółta, blado-pomarańczowa
G	Sacharoza	SUC	Żółta, żółto-zielona	Zielona
F	Maltoza	MLT	Żółta, żółto-zielona	Zielona
E	Laktoza	LAC	Żółta, żółto-zielona	Zielona
D	Galaktoza	GAL	Żółta, żółto-zielona	Zielona
C	Trehaloza	TRE	Żółta, żółto-zielona	Zielona
B	Celobioza	CEL	Żółta, żółto-zielona	Zielona
A	Prolin	PRO	Żółta, żółtawa	Bezbarwna

**Właściwości zestawu:**

Zestaw został przetestowany za pomocą 60 szczepów. 50 szczepów zidentyfikowano prawidłowo (83,3%).

**Najczęstsze możliwe przyczyny niepowodzenia podczas identyfikacji:**

- Mieszana, lub kontaminowana kultura: należy pracować z czystą kulturą izolowaną z zalecanych podłoży hodowlanych. Kultura powinna być 24 godz., lub 48 godz. w przypadku wolniej rosnącej kultury grzybów drożdżopodobnych.
- Zastosowanie inokulum niskiej gęstości, lub zbyt niska objętość inokulum: należy przestrzegać zalecaną gęstość inokulum 3 McF. Dokładnie homogenizować.
- Inokulum przedostało się do sąsiedniego rzędu paska, przygotowanego do następnej badanej kultury.
- Nieprzestrzeganie któregośkolwiek z punktów instrukcji obsługi.
- Nietypowy szczep, lub przedstawiciel gatunku, lub bliskiego rodzaju, który nie jest wymieniony na liście taksonów.

**Likwidacja wykorzystanego materiału:**

Po zużyciu należy włożyć płytkę do pojemnika dla materiału zakaźnego i następnie wysterylizować w autoklawie lub spalić.

**Kontrola jakości CANDIDA-Screen:**

Dla wewnętrznej kontroli jakości zestawu zalecane są następujące szczepy kontrolne:

**Candida albicans CCM 8261 (ATCC 90028)**

**Cryptococcus neoformans CCM 8312 (ATCC 90112)**

**Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae CCM 5852 (ATCC 13882)**

Ww. szczepy dostarcza Czeska Kolekcja Mikroorganizmów, Uniwersytet Masaryka, Tvrdého 14, 602 00 Brno, CZ, tel. (+420) 549 49 1 430, fax: (+420) 543 247 339; 541 211 214, E-mail: ccm@sci.muni.cz. Szczepy dostarczane są w postaci liofilizowanej lub na krążkach żelatynowych.

Uwaga: Do kontroli prawidłowego funkcjonowania zestawu należy zawsze stosować świeże szczepy kontrolne CCM. Szczepy te służą do kontroli prawidłowego funkcjonowania zestawu, nie do prawidłowości lub powodzenia identyfikacji.

Data ostatniej rewizji: 14.3.2011

**Szczepy kontrolne:**

Wiersz	H	G	F	E	D	C	B	A
<b>Candida albicans CCM 8261</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	-	+	+	-	+	v	-	+
<b>Cryptococcus neoformans CCM 8312</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Klebsiella pneumoniae CCM 5852</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	-	+	+	+	+	+	+	-

**Wyjaśnienia:**

+ = dodatnia reakcja

- = ujemna reakcja

v = zmienna reakcja

**Tabela różnicująca:**

Taxon	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
Candida albicans	-	+	+	-	+	+	-	+
Candida glabrata	-	-	-	-	-	+	-	-
Candida guilliermondii	-	+	-	-	+	v	(-)	+
Candida kefyr	-	+	-	(+)	+	-	v	-
Candida krusei	-	-	-	-	(-)	-	-	(-)
Candida lipolytica	(+)	-	-	-	(-)	-	-	+
Candida lusitanae	-	+	(+)	-	v	v	+	+
Candida parapsilosis	-	+	v	-	+	v	-	+
Candida tropicalis	-	+	+	-	+	+	-	-
Cryptococcus neoformans	+	v	(-)	-	v	(-)	(-)	-
Geotrichum sp.	-	-	-	-	v	-	-	(-)
Saccharomyces cerevisiae	-	+	(+)	-	v	v	-	-
Trichosporon sp.	(+)	-	-	-	-	-	-	(-)

Wyjaśnienia: + = Reakcja dodatnia - = Reakcja ujemna v = Reakcja zmienna (+) = Reakcja w większości dodatnia (-) = Reakcja w większości ujemna

WYTWÓRCA: Erba Lachema s.r.o., Karásek 1d, 621 33 BRNO, REPUBLIKA CZESKA

Przedstawicielstwo w Polsce: Ul. Szamocińska 21, 61-417 Poznań, tel. kom: +48 510 251 115, fax: +48 61 830 76 53, e-mail: tvrdon@lachema.com, www.lachema.com.



Кат. N.: 10010269

Для микробиологии

Диагностический набор КАНДИДА-Скрин предназначен для идентификации наиболее часто встречаемых видов патогенных грибов в клиническом материале. Набор содержит 3 стриппированные микротитровальные пластинки, на каждой из которой можно провести идентификацию 12 культур (8 тестов на 1 культуру).

**Набор КАНДИДА-Скрин содержит:**

- 3 стриппированные микротитровальные пластинки (каждая для идентификации 12 культур)
- Инструкцию пользователя
- 3 полиэтиленовых пакета для инкубации
- Пакет для хранения частично использованных пластинок
- Цветную шкалу
- Бланки результатов
- Крышку

**Условия хранения, сроки годности:**

- КАНДИДА-Скрин должен храниться при температуре (+2 to +8)° C. Срок годности указан на каждой упаковке.

**Предупреждение:**

Набор КАНДИДА-Скрин предназначен только для профессионального использования специально обученным персоналом. Следует соблюдать правила безопасности при работе с инфекционным материалом.

**Инструкция к постановке КАНДИДА-Скрин**

**Необходимые материалы (не включены в набор):**

- Чашки Петри с питательной средой (2% Сабуро-агар с декстрозой без добавок, кровяной агар или другая подходящая неселективная среда)
- Парафиновое масло стерильное (кат. N. 10003371 - 40 определений)
- Пробирки (100x15 мм) со стерильным незабуферным физиологическим раствором
- Прибор для определения мутности суспензии Денс-Ла-Метр II (кат. N 50001529)
- Встряхиватель типа Vortex V1
- Автоматическая микропипетка, 0,1 мл, стерильные наконечники
- Термостат на 25 - 30° C
- Традиционное оснащение микробиологической лаборатории (петли, горелки, маркеры)

**Выделение культуры:**

- Выделите чистую культуру, пользуясь общепринятыми методами, с 2% Сабуро-агара с декстрозой без добавок или с кровяного агара. Другие питательные среды рекомендуется предварительно протестировать на контрольных штаммах.

**Приготовление бактериальной суспензии:**

- Из чистой 24-часовой культуры (48-часовой культуры для медленно растущих культур) приготовьте суспензию исследуемого штамма в стерильном незабуферном физиологическом растворе, мутность должна соответствовать 3 ед. по шкале МакФарланда. Тщательно перемешайте суспензию, используя для этого встряхиватель типа Vortex.

**Контроль чистоты культуры:**

- Из приготовленной суспензии сделайте посев для определения чистоты культуры на 2% Сабуро-агар с декстрозой, инкубируйте 24 часа. При получении слабого роста увеличьте время инкубации еще на 24 часа.

**Подготовка пластинки КАНДИДА-Скрин:**

- Подготовьте рамку с крышкой.
- Вскройте пакет из фольги, вытащите планшет, снимите защитный слой из фольги.
- Возьмите необходимое количество пластинок (стрипов) по числу исследуемых культур (1 стрип содержит 8 тестов для 1 культуры), вставьте стрипы в подготовленную рамку, прикройте крышкой, напишите номера штаммов.
- Оставшиеся стрипы положите в алюминиевый пакет для частично использованных пластинок и храните в сухом месте при комнатной температуре для последующего использования. Предохраняйте их от влаги, используйте в течение 4 нед с момента вскрытия.
- Рамку с крышкой дезинфицируйте после каждого употребления.

**Инокуляция:**

- Суспензию тщательно встряхните, внесите по 100 мкл суспензии в каждую лунку.
- Добавьте по 3-4 капли парафинового масла в каждую лунку.

**Инкубация:**

- Вложите подготовленные для инкубации стрипы в полиэтиленовый пакет, конец его подогните для предотвращения высыхания при инкубации.
- Инкубируйте при 25 - 30° C в течение 24 часов.
- Для медленно растущих микроорганизмов, таких как *C. neoformans*, продлите время инкубации еще на 24 часа.

**Учет результатов:**

- Учтите результаты реакций через 24 часа (при необходимости, через 48 часов). Для этого вытащите пластинки из полиэтиленового пакета и оцените результаты реакций по таблице **Интерпретация реакций**, по результатам идентификации контрольных штаммов или по цветной шкале. Результаты запишите в бланк анализа.

Для оценки результатов используйте книгу кодов (**Code book**) входящую в набор, или дифференциальную таблицу, или программное обеспечение «Система микробиологического мониторинга «Микроб-2». При учете результатов фотометрически необходимы также анализатор Мультискан Ассент и программа «Микроб-Автомат»

**Дополнительные тесты:**

При идентификации патогенных грибов необходимо учитывать результаты дополнительных тестов, описанных ниже:

**GET (Трубки роста)**

- Инокулируйте колонию грибов в 0,1 мл сыворотки крови человека или животного (мутность 0.5-1 McF)
- Инкубируйте при температуре 35–37° C в течение 3 часов.
- Наличие трубок роста определите при микроскопии (увеличение 100x). Трубки роста, характерные для рода *Candida* представляют собой нитевидные образования. После суточной инкубации трубки роста в виде нитевидных образований не встречаются у представителей данного рода.

**PSH (Псевдогифы)**

Для рода *Candida* характерно образование псевдомицелия, который формируется на простых субстратах.

- Приготовьте рисовый агар согласно инструкции производителя и по стандартной прописи.
- Сделайте штриховой посев на чашке с рисовым агаром, разлитым тонким слоем и накройте покровным стеклом.
- Инкубируйте при температуре 25–30° C и просматривайте чашку под микроскопом (увеличение 100x) ежедневно в течение 4-х суток.

**Оценка:** псевдомицелий, содержащий псевдогифы с терминальными хламидоспорами (споры со сферической поверхностью и преломляющей клеточной стенкой), характерны для *Candida albicans*. Большинство видов *Candida* образуют псевдомицелий, содержащий псевдогифы без хламидоспор. Однако некоторые виды псевдогифы не образуют.

**НУР – Гифы (истинные гифы)**

Родовым признаком для грибов родов *Geotrichum* и *Trichosporon* является образование истинных гифов и артроспор, которые могут быть определены по разделению клеточной стенки на прямоугольники.

**Интерпретация реакций:**

Лунка	Тест	Аббревиатура	Реакция:	положительная	отрицательная
H	Уреаза	URE		красный, красно-ранжевый	бледно-оранжевый, оранжевый
G	Сахароза	SUC		желтый, желто-зеленый	зеленый
F	Мальтоза	MLT		желтый, желто-зеленый	зеленый
E	Лактоза	LAC		желтый, желто-зеленый	зеленый
D	Галактоза	GAL		желтый, желто-зеленый	зеленый
C	Трегалоза	TRE		желтый, желто-зеленый	зеленый
B	Целлобиоза	CEL		желтый, желто-зеленый	зеленый
A	Пролин	PRO		желтый, желтоватый	бесцветный

**Свойства:**

Набор был протестирован на 60 культурах, 83,3% (50 культур) были идентифицированы правильно.

**Наиболее частые причины неудач при идентификации:**

- Смешанная культура: работайте только с чистой (24- или 48-часовой) культурой, снятой с рекомендованных сред.
- Использование суспензии низкой плотности или меньшего объема (следует строго соблюдать требования инструкции, тщательно перемешивать суспензию, мутность которой должна быть 3 ед. по шкале МакФарланла).
- Перекрестная контаминация лунок.
- Нарушение рекомендованного хода исследования.
- Исследуемый штамм или вид не включен в идентификационную таблицу или в базу данных программного обеспечения.

**Утилизация:**

После использования материал необходимо продезинфицировать или проавтоклавировать.

**Контроль качества набора:**

Для проведения внутреннего контроля мы рекомендуем следующие штаммы:

*Candida albicans* CCM 8261 (ATCC 90028)

*Cryptococcus neoformans* CCM 8312 (ATCC 90112)

*Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* CCM 5852 (ATCC 13882)

Эти штаммы можно заказать в государственном институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А Тарасевича по адресу: 121002, Москва, Сивцев Вражек переулок, д.41, тел. 8 (499) 241-39-22. Культуры поставляются в ампулах в лиофилизированной форме.

Внимание:

Для контроля функционирования набора должны быть использованы только свежие культуры данных штаммов. Эти культуры не должны использоваться для проверки правильности или точности идентификации.

Дата проведения последнего контроля: 14.3.2011

**Контрольные штаммы:**

Ряд	H	G	F	E	D	C	B	A
<b>Candida albicans CCM 8261</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	-	+	+	-	+	d	-	+
<b>Cryptococcus neoformans CCM 8312</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>Klebsiella pneumoniae CCM 5852</b>								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	-	+	+	+	+	+	+	-

**Обозначения:**

+ = положительная реакция

- = отрицательная реакция

d = варибельная реакция

**Дифференциальная таблица:**

Taxon	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
<i>Candida albicans</i>	-	+	+	-	+	+	-	+
<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	-	+	-	-	+	d	(-)	+
<i>Candida kefyr</i>	-	+	-	(+)	+	-	d	-
<i>Candida krusei</i>	-	-	-	-	(-)	-	-	(-)
<i>Candida lipolytica</i>	(+)	-	-	-	(-)	-	-	+
<i>Candida lusitaniae</i>	-	+	(+)	-	d	d	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>	-	+	d	-	+	d	-	+
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	d	(-)	-	d	(-)	(-)	-
<i>Geotrichum sp.</i>	-	-	-	-	d	-	-	(-)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+	(+)	-	d	d	-	-
<i>Trichosporon sp.</i>	(+)	-	-	-	-	-	-	(-)

**Обозначения:**

+ = положительная реакция - = отрицательная реакция d = варибельная реакция

(+) = большей частью положительная реакция (-) = большей частью отрицательная реакция