



E1-831-040



Hướng dẫn sử dụng

Thuốc thử xét nghiệm tính nhạy cảm với thuốc kháng nấm của nấm men và *Cryptococcus* spp.

MICRONAUT-AM MIC Antifungal Agents MIC

Các đĩa vi giếng để xét nghiệm tính nhạy cảm tự động hoặc thủ công của nấm men và *Cryptococcus* spp trong lâm sàng

Dùng cho chẩn đoán *in-vitro*



Ngôn ngữ: Tiếng Việt

Lịch sử tài liệu

Tên:	Hướng dẫn sử dụng MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC
Bản sửa đổi:	Bản sửa đổi B (Tháng Tám 2021)
Bản sửa đổi lần đầu:	Tháng Chín 2020

Bảng bên dưới mô tả những thay đổi quan trọng so với bản sửa đổi trước đó của tài liệu này.

Mục	Thay đổi
–	Thay đổi chủ sở hữu thành Bruker Daltonics GmbH & Co. KG

Mục lục

Lịch sử tài liệu	2
Mục lục.....	3
1 Mục đích sử dụng	4
2 Mô tả sản phẩm/ vật tư	5
3 Thành phần của môi trường	6
4 Thời hạn sử dụng / lưu trữ / thải bỏ.....	7
5 Biện pháp phòng ngừa.....	8
6 Quy trình xét nghiệm cho nấm men không khó mọc	9
6.1 Chuẩn bị mẫu.....	9
6.2 Chuẩn bị huyền dịch cấy cho nấm men không khó mọc.....	9
6.3 Cấy mẫu.....	9
6.4 Niêm phong và ủ.	9
6.5 Đọc kết quả.....	9
6.6 Phân tích.....	10
6.7 Đánh giá.....	11
6.8 Giá trị MIC.....	11
6.9 Bỏ qua giếng.....	11
7 Quy trình xét nghiệm cho nấm men khó mọc và <i>Cryptococcus</i> spp	12
7.1 Chuẩn bị mẫu.....	12
7.2 Chuẩn bị huyền dịch cấy cho nấm men khó mọc.....	12
7.3 Chuẩn bị huyền dịch cấy cho <i>Cryptococcus</i> spp.....	12
7.4 Cấy mẫu.....	13
7.5 Niêm phong và ủ.	13
7.6 Đọc kết quả.....	13
7.7 Phân Tích.....	13
7.8 Đánh Giá.....	13
7.9 Giá trị MIC.....	13
7.10 Bỏ qua giếng.....	14
8 Lưu ý kỹ thuật	15
9 Kiểm soát chất lượng	16
10 Dữ liệu Lâm sàng và hiệu năng phân tích	17
11 Bảo hành.....	18
12 Giới hạn	19
13 Định nghĩa của các ký hiệu	20
14 Tài liệu tham khảo.....	21
15 Hướng dẫn tóm tắt cho MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC cho nấm men không khó mọc	22
16 Hướng dẫn tóm tắt cho MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC cho nấm men khó mọc và <i>Cryptococcus</i> spp.	23
17 Chủ sở hữu.	24

1 Mục đích sử dụng

Đĩa xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC là một thiết bị chẩn đoán in-vitro để xét nghiệm tính nhạy cảm với thuốc kháng nấm của các loại nấm men và *Cryptococcus* spp. trong lâm sàng trong môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose. Đĩa xét nghiệm được sử dụng để phát hiện khả năng kháng lại các thuốc kháng nấm. Xét nghiệm tính nhạy cảm dựa trên sự bù nước của các thuốc kháng nấm bằng cách thêm huyền dịch nấm men/ *Cryptococcus* spp tiêu chuẩn. Giá trị MIC được xác định theo tiêu chuẩn EUCAST.

Sự phát triển của các loại nấm men và *Cryptococcus* spp. trong lâm sàng được biểu thị bằng sự thay đổi màu từ xanh dương sang hồng của chất chỉ thị oxy hóa khử (AST-Indicator), chất này được thêm vào môi trường xét nghiệm. Thêm dung dịch xanh Methylene tạo điều kiện thuận lợi cho việc đọc các kháng nấm đồ của nấm men với tác động kéo dài.

Đĩa xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC được đo bằng máy đo quang đã được xác nhận và kết quả được đánh giá bằng phần mềm MICRONAUT. Ngoài ra, đĩa có thể được đọc trực quan và các giá trị MIC có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các giá trị điểm gãy EUCAST hiện tại. Các kết quả xét nghiệm phải được phiên giải bởi nhân viên có chuyên môn. Các kết quả có thể chỉ được sử dụng để hỗ trợ một liệu pháp kháng nấm mục tiêu.

2 Mô tả sản phẩm/ vật tư

Thành phần

Mỗi gói đủ cho 40 xét nghiệm tính nhạy cảm và bao gồm:

- 40 đĩa MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC. Đối với mỗi đĩa vi giống, có thể thực hiện một xét nghiệm. Nồng độ của các thuốc kháng nấm có thể được tìm thấy trong hồ sơ đánh giá sản phẩm cụ thể, xem phần 6.7.
- Giấy bạc niêm phong (không đục lỗ)

Thuốc thử và vật tư yêu cầu bổ sung

- MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose; Chủ sở hữu: Bruker Daltonics GmbH & Co. KG
- AST-Reagent Kit
- NaCl 0.9%
- Giếng chứa 1 kênh
- Pipette 8 kênh (100-1,200µL) bao gồm đầu tip.
- Máy đo quang (được xác nhận cho hệ thống MICRONAUT)
- Phần mềm MICRONAUT

Vui lòng liên hệ với nhà phân phối tại địa phương để biết mã sản phẩm của thuốc thử và vật tư

Vật tư phòng xét nghiệm bổ sung

- Tủ ủ
- McFarland chuẩn 0.5 hoặc máy đo mật độ
- Thạch Sabouraud glucose (dextrose) (4%) (không có phụ gia)

Sử dụng môi trường thạch khác ngoài Sabouraud glucose (dextrose) (4%) (không có phụ gia) phải được xác nhận bởi người dùng.

- Potato dextrose agar, xem phần 9
- Khuyên cấy
- Bút đánh dấu
- Pipette có thể điều chỉnh, phạm vi 0.5-10 µL, 20-200 µL, 1,000-5,000 µL

3 Thành phần của môi trường

Môi trường	Thành phần
NaCl 0.9%, 1L	Sodium chloride
MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose ¹ 20 lọ 11.5 mL (\pm 0.5 mL) mỗi lọ	RPMI-1640 MOPS Glucose
AST-Indicator ¹ ống 4 ml (Thành phần trong AST-Reagent Kit)	Resazurin
Dung dịch xanh Methylene ¹ ống 4 ml (Thành phần trong AST-Reagent Kit)	Xanh Methylene

Chú ý Việc xác định các giá trị MIC sử dụng hệ thống xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC yêu cầu chỉ dùng môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose và AST-Reagent Kit được sản xuất bởi Bruker Daltonics GmbH & Co. KG. Vui lòng liên hệ với nhà phân phối tại địa phương bạn để biết mã sản phẩm của thuốc thử và môi trường.

¹Thành phần bí mật

4 Thời hạn sử dụng / lưu trữ / thải bỏ

Các đĩa xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC có thể được sử dụng cho đến ngày hết hạn được chỉ định khi được bảo quản trong bao bì gốc ở 15 - 25 °C. Bảo quản MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose ở 2 -25 °C và **AST-Reagent Kit** ở **2 -8 °C**. Xem trên nhãn sản phẩm để biết thời hạn sử dụng của AST-Reagent Kit (chưa mở/ đã mở) và môi trường. Mặt khác, các điều kiện bảo quản quy định trên sản phẩm phải được tuân thủ.

Thải bỏ phương tiện vận chuyển và đóng gói thứ cấp của đĩa xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC phải tuân theo các quy định xử lý chất thải của địa phương.

Làm theo hướng dẫn trong mục 5 để thải bỏ đĩa xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC đã qua sử dụng.

5 Các biện pháp phòng ngừa

- Chỉ được sử dụng cho chẩn đoán *in-vitro*.
- Không pipet thuốc thử bằng miệng.
- Không sử dụng cho mục đích khác ngoài mục đích sử dụng.
- Mẫu cấy, nấm men và/hoặc *Cryptococcus* spp., và đĩa xét nghiệm đã cấy phải được xử lý như những vật có khả năng gây nguy hiểm sinh học và phải được xử lý cẩn thận bởi nhân viên đã được đào tạo và chứng nhận và cần tuân thủ các biện pháp phòng ngừa có liên quan. Sử dụng kỹ thuật vô trùng trong toàn bộ quy trình xét nghiệm. Để biết thêm thông tin, xem phiên bản hiện tại của “An Toàn Sinh Học Trong Phòng Xét Nghiệm Vi Sinh và Y Sinh, Số Xuất bản HHS (CDC)” hoặc các quy định quốc gia tương ứng.
- Một túi chỉ thị có chất hút ẩm (“gel xanh”) được thêm vào các đĩa xét nghiệm trong bao bì ban đầu (túi giấy nhôm tổng hợp). Chất hút ẩm chứa cobalt chloride. Không làm hỏng túi chỉ thị. Sự thay đổi màu sắc của túi chỉ thị từ xanh lam sang hồng có thể là dấu hiệu của sự xâm nhập của hơi ẩm (ví dụ: do hư hỏng bao bì ban đầu [lá nhôm tổng hợp]). Không sử dụng các đĩa như vậy.
- Sau khi đọc và đánh giá kết quả xét nghiệm, tất cả các mẫu, các vật đã cấy hoặc bị nhiễm (đầu pipet, ngăn chứa và đĩa xét nghiệm) phải được hấp khử trùng, đốt hoặc xử lý bằng dung dịch khử trùng diệt nấm trước khi thải bỏ.
- Các hướng dẫn sử dụng phải được tuân thủ nghiêm ngặt; bất kỳ sai lệch nào có thể ảnh hưởng đến chất lượng của các kết quả.
- Kết quả xét nghiệm nên được phiên giải bởi các nhân viên đã qua đào tạo và có kinh nghiệm về vi sinh. Triệu chứng lâm sàng, nguồn gốc của các mẫu, hình thái khuẩn lạc và hình thái hiển vi, huyết thanh học và kết quả định danh phải được xem xét khi phiên giải kết quả.

6 Quy trình xét nghiệm cho nấm men không khó mọc

6.1 Chuẩn bị mẫu

- Chuẩn bị ống có chứa 2-5 mL NaCl 0.9%, pH 5.5-6.5, để chuẩn bị huyền dịch nấm men theo nồng độ McFarland chuẩn 0.5
- Chuẩn bị ống chứa 4 mL NaCl 0.9%, pH 5.5-6.5, để pha loãng theo tỉ lệ 1:20.
- Chuẩn bị một ống Môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose 11.5 mL. Nếu môi trường bảo quản trong tủ lạnh, làm ấm môi trường trong tủ ủ từ 35 - 37 °C trước khi sử dụng. Ngay trước khi xét nghiệm, bổ sung vào Môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose các chất như sau:
 - **Đọc bằng máy đo quang:** Bổ sung với **50 µL** AST- Indicator và **50 µL** dung dịch xanh Methylene.
 - **Đọc bằng mắt:** Bổ sung với **100 µL** AST-Indicator và **50 µL** dung dịch xanh Methylene.

6.2 Chuẩn bị huyền dịch cấy cho nấm men không khó mọc

- Lấy vài khuẩn lạc rời từ môi trường nuôi cấy thuần 24 giờ tuổi trên thạch Sabouraud-Glucose (dextrose) (4%) (không có phụ gia), đã được ủ ở 30°C.
- Hòa khuẩn lạc trong 2 – 5 mL NaCl 0.9% cho đến đạt được độ đục phù hợp với tiêu chuẩn McFarland 0.5 (huyền dịch nấm men).
- Chuẩn bị **dung dịch pha loãng 1:20:** Dùng pipette hút 200 µL huyền dịch nấm men vào 4 mL NaCl 0.9% và trộn đều.
- Chuẩn bị **dung dịch pha loãng 1:50:** Dùng pipette hút 200 µL huyền dịch pha loãng 1:20 vào 11.5 mL Môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose và trộn đều.
- **Thay thế cho việc chuẩn bị huyền dịch cấy cho nấm men không khó mọc:**
 - Chuyển 10 µL huyền dịch nấm men có độ đục tiêu chuẩn McFarland 0.5 vào 11.5 mL Môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose và trộn đều.

6.3 Cấy mẫu

- Lấy đĩa xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC ra khỏi bao bì không quá 30 phút trước khi cấy mẫu và loại bỏ túi chỉ thị.
- Ghi nhãn lên đĩa xét nghiệm
- Đổ môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose đã cấy với chủng phân lập nấm men không khó mọc vào giếng chứa 1 kênh, xem phần 6.2.
- Cấy thủ công các đĩa vi giếng với 100 µL cho mỗi giếng bằng cách sử dụng pipet 8 kênh.

6.4 Niêm phong và ủ

- Sau khi cấy mẫu, bọc đĩa xét nghiệm bằng Giấy bạc niêm phong không đục lỗ (xếp chồng tối đa 5 đĩa)
- Ủ các đĩa xét nghiệm theo sự thay đổi màu sắc của chất kiểm soát tăng trưởng (từ xanh lam sang hồng) ở điều kiện hiếu khí trong khoảng từ 35 – 37°C trong 24-48 giờ.

6.5 Đọc kết quả

- Tháo giấy bạc niêm phong.
- Lau sạch phần đáy của đĩa xét nghiệm.
- Đọc các đĩa xét nghiệm bằng máy đo quang hoặc bằng mắt thường.

6.6 Phân tích

- **Đo quang:** Các kết quả được xác định bằng phép đo quang ở một bước sóng xác định. Chúng được đánh giá, phiên giải và tính hợp lý của chúng được kiểm tra bằng Phần mềm MICRONAUT, xem Hướng dẫn MCN6.

Giếng kiểm soát sinh trưởng (GC) phải thể hiện sự sinh trưởng (thay đổi màu từ màu xanh lam sang màu hồng), sẽ không nhìn thấy được sự sinh trưởng trong mẫu kiểm soát âm tính (NGC) vì nó đóng vai trò như một tiêu chuẩn đo màu âm tính (không thay đổi màu = màu xanh da trời). Nếu khác, xét nghiệm phải được làm lại.

Kết quả xét nghiệm được hiển thị trên màn hình hoặc trên bản in của báo cáo Ghi chú có thể xuất hiện bên dưới kết quả xét nghiệm cho thấy sự sinh trưởng không đầy đủ.

- **Đọc bằng mắt:** Kết quả đọc bằng mắt nên được lưu lại trên bản in hoặc biên bản đánh giá. Xem phần 6.7:

xanh lam = không sinh trưởng



hồng = sinh trưởng



mất màu = sinh trưởng quá mức



Sự mất màu của giếng chứa là kết quả của việc khử resorufin thành dihydroresorufin do sự phát triển mạnh của vi sinh vật.

Trong trường hợp các điểm cuối không rõ ràng khi đọc bằng mắt, nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) có thể được định nghĩa là nồng độ mà tại đó vẫn có nhìn thấy rõ ràng màu xanh lam khi so sánh với kiểm soát sinh trưởng (GC) (giảm 50% sinh trưởng).

- **Tác động kéo dài:** Hệ thống xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC xác định giá trị MIC đối với các thuốc kháng nấm được sử dụng cùng với AST-Reagent Kit, ngoài resazurin, còn chứa dung dịch xanh Methylene làm chất chỉ thị oxy hóa khử. Thêm dung dịch xanh Methylene vào chế phẩm xét nghiệm giúp dễ dàng đọc các biểu đồ kháng nấm bằng cách ngăn chặn sự phát triển nền của các loại nấm men có xu hướng gây hiệu ứng tác động kéo dài. Tác động kéo dài này thể hiện sự gia tăng chậm tác dụng ức chế azole (ví dụ như đối với fluconazole, itraconazole, posaconazole, voriconazole, v.v.) và do đó làm giảm dần sự phát triển của nấm men mà không có điểm kết thúc rõ ràng, xem hình bên dưới:



Chủng nấm men không có tác động kéo dài



Chủng nấm men với tác động kéo dài

□ = Đọc giá trị MIC

Sự xuất hiện của các tác động kéo dài là đặc trưng cho biến dạng; chúng xảy ra thường xuyên hơn với tốc độ phát triển nhanh của nấm men (ví dụ: *Candida albicans*, *Candida glabrata*).

6.7 Đánh giá

Việc đánh giá tính nhạy cảm *in-vitro* một cách đáng tin cậy đòi hỏi mối tương quan giữa tính nhạy cảm của mầm bệnh và thành công điều trị và cần được xác minh bằng phân tích kết quả của các nghiên cứu lâm sàng. Tuy nhiên, hiện vẫn còn nhiều vấn đề đáng kể trong việc tìm kiếm các mối tương quan.

Do đó, giá trị điểm gãy MIC chỉ được xác định cho một phổ giới hạn của các thuốc kháng nấm.

Để đánh giá quang học của đĩa xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC, các giá trị điểm gãy EUCAST MIC hiện tại được lưu trữ trong phần mềm MICRONAUT được sử dụng.

Để đánh giá trực quan đĩa xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC, có sẵn tài liệu về cách đọc và diễn giải MIC theo tiêu chuẩn EUCAST. Nó được cập nhật hàng năm. Biên bản đánh giá không phải là một phần của hướng dẫn sử dụng này.

6.8 Giá trị MIC

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được định nghĩa là nồng độ thấp nhất của thuốc kháng nấm có tác dụng ức chế sự phát triển có thể nhìn thấy của chủng phân lập nấm men hoặc *Cryptococcus* spp. (màu xanh lam của môi trường).

Xác định MIC yêu cầu chứng dương (phát triển quá mức = đổi màu sang hồng). Việc xác định MIC dựa trên phương pháp pha loãng canh trường, cho phép đưa ra tuyên bố định lượng về tính nhạy cảm của nấm men hoặc *Cryptococcus* spp. đã được thử nghiệm lâm sàng với thuốc kháng nấm.

6.9 Bỏ qua giếng

Đôi khi, các giếng bị bỏ qua có thể xảy ra trong đĩa vi giếng. Một giếng bị bỏ qua được đặc trưng bởi sự phát triển (giếng màu hồng) trong một hoặc nhiều giếng được pha loãng nối tiếp thuốc kháng nấm trong khi các giếng có nồng độ thấp hơn / cao hơn tiếp theo không có sự phát triển (giếng màu xanh lam).

7 Quy trình xét nghiệm cho nấm men khó mọc và *Cryptococcus* spp

Xác định MIC của nấm men và *Cryptococcus* spp. sử dụng phương pháp pha loãng vi lượng đòi hỏi sự phát triển đủ của các chủng trong Môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose. Để đảm bảo sự phát triển của các loại nấm men khó tính và *Cryptococcus* spp. trong MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose, có thể cần tuân thủ các điều kiện thử nghiệm đặc biệt như một phần của phép xác định MIC. Khuyến cáo sau đây để sửa đổi quy trình xét nghiệm áp dụng cho các chủng không phải albicans / không phải glabrata phát triển chậm và các chủng *Cryptococcus* spp.

7.1 Chuẩn bị mẫu

- Chuẩn bị ống có chứa 2-5 mL NaCl 0.9%, pH 5.5-6.5, để chuẩn bị huyền dịch nấm men *Cryptococcus* theo nồng độ McFarland chuẩn 0.5
- Chuẩn bị ống chứa 4 mL NaCl 0.9%, pH 5.5-6.5, để pha loãng theo tỉ lệ 1:20.
- Chuẩn bị một ống Môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose 11.5 mL. Nếu môi trường bảo quản trong tủ lạnh, làm ấm môi trường trong tủ ủ trước khi sử dụng (nấm men khó mọc: 35– 37°C *Cryptococcus* spp.: 30°C). Ngay trước khi xét nghiệm, thêm chất bổ sung vào Môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 như sau:
 - **Độc bằng đo quang:** Bổ sung **50 µL** AST-Indicator
 - **Độc bằng mắt:** Bổ sung **100 µL** AST-Indicator

Không bổ sung dung dịch xanh methylene.

7.2 Chuẩn bị huyền dịch cấy cho nấm men khó mọc

- Chọn một số khuẩn lạc rời từ môi trường nuôi cấy thuần khiết 24 giờ tuổi từ thạch Sabouraud glucose (dextrose) (4%) (không có phụ gia) đã được ủ ở 30 ° C.
- Đồng nhất các khuẩn lạc trong 2–5 mL NaCl 0.9% cho đến khi độ đục phù hợp với tiêu chuẩn McFarland 0.5 (huyền dịch nấm men).
- Chuẩn bị **dung dịch pha loãng 1:20:** Dùng pipette hút 200 µL huyền dịch nấm men vào 4 mL NaCl 0.9% và trộn đều.
- Chuẩn bị **dung dịch pha loãng 1:50:** Dùng pipette hút 200 µL huyền dịch pha loãng 1:20 vào 11.5 mL Môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose và trộn đều.
- **Thay thế cho việc chuẩn bị huyền dịch cấy cho nấm men**
 - Chuyển 10 µL huyền dịch nấm men có độ đục tiêu chuẩn McFarland 0.5 vào 11.5 mL Môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose và trộn đều.

7.3 Chuẩn bị huyền dịch cấy cho *Cryptococcus* spp.

- Chọn một số khuẩn lạc rời từ môi trường nuôi cấy thuần khiết 24 giờ tuổi từ thạch Sabouraud glucose (dextrose) (4%) (không có phụ gia), đã được ủ ở 30°C. Đối với các chủng phân lập sinh trưởng chậm, phải kéo dài thời gian ủ nếu cần.
- Đồng nhất các khuẩn lạc trong 2–5 mL NaCl 0.9% cho đến khi độ đục phù hợp với tiêu chuẩn McFarland 0.5 (huyền dịch *Cryptococcus* spp.).

- Chuẩn bị **dung dịch pha loãng 1:20**: Dùng pipette hút 200 μ L huyền dịch *Cryptococcus* spp. vào 4 mL NaCl 0.9% và trộn đều.
- Chuẩn bị **dung dịch pha loãng 1:50**: Dùng pipette hút 2,000 μ L huyền dịch pha loãng 1:20 vào 11.5 mL Môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose và trộn đều.
- **Thay thế cho việc chuẩn bị huyền dịch cấy *Cryptococcus* spp.**
Chuyển 100 μ L huyền dịch *Cryptococcus* spp. có độ đục tiêu chuẩn McFarland 0.5 vào 11.5 mL Môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose và trộn đều.

7.4 Cấy mẫu

- Lấy đĩa xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC ra khỏi bao bì không quá 30 phút trước khi cấy mẫu và loại bỏ túi chỉ thị.
- Ghi nhãn lên đĩa xét nghiệm.
- Đổ môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose đã cấy với chủng phân lập nấm men khó mọc hoặc *Cryptococcus* spp vào giếng chứa 1 kênh, xem phần 7.2 và 7.3.
- Cấy thủ công các đĩa vi giếng với 100 μ L cho mỗi giếng bằng cách sử dụng pipet 8 kênh.

7.5 Niêm phong và ủ

- Sau khi cấy mẫu, bọc đĩa xét nghiệm bằng giấy bạc niêm phong không đục lỗ (**không xếp chồng các đĩa xét nghiệm lên nhau**)
- Ủ các đĩa xét nghiệm theo sự thay đổi màu sắc trong khoảng từ 24-48 giờ ở 35-37 °C (*Candida* spp.) hoặc trong 24-72 giờ ở 30 °C (*Cryptococcus* spp.) trong điều kiện hiếu khí.

7.6 Đọc kết quả

- Tháo giấy bạc niêm phong
- Lau sạch phần đáy của đĩa xét nghiệm.
- Đọc các đĩa xét nghiệm bằng máy đo quang hoặc bằng mắt thường.

7.7 Phân Tích

Việc phân tích được thực hiện như mô tả trong phần 6.6.

7.8 Đánh Giá

Việc đánh giá được thực hiện như mô tả trong phần 6.7.

7.9 Giá trị MIC

Để biết định nghĩa về giá trị MIC và điều kiện tiên quyết để xác định giá trị MIC, hãy tham khảo phần 6.8.

7.10 Bỏ qua giếng

Định nghĩa về “bỏ qua giếng” xem phần 6.9

8 Lưu ý kỹ thuật

Để có được kết quả tốt nhất, thực hiện cẩn thận theo các điểm được liệt kê dưới đây của hướng dẫn để sử dụng.

- Đĩa xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC chỉ được sử dụng một lần. Không tái sử dụng.
- Sử dụng lúca cấy thuần khiết từ thạch Sabouraud glucose (dextrose) (4%) (không có phụ gia) không quá 24 giờ và được ủ ở 30 °C. Đối với các chủng phân lập sinh trưởng chậm, phải kéo dài thời gian ủ nếu cần.
- Cẩn thận không để giọt huyền phù nấm men hoặc huyền phù *Cryptococcus* spp. dính ở mép giếng sau khi cấy đĩa xét nghiệm. Các giọt ở mép giếng không tiếp xúc với thuốc kháng nấm. Điều này có thể dẫn đến sự phát triển trong các giếng tương ứng (bỏ qua giếng).
- Dung dịch NaCl 0.9%, giá trị pH 5.5–6.5.
- Đảm bảo điều chỉnh độ đục huyền phù chính xác theo tiêu chuẩn McFarland 0.5. Đồng nhất hóa vừa đủ huyền phù đã chuẩn bị.
- Vì lý do ổn định, phải thêm AST-Indicator và dung dịch xanh Methylene ngay trước khi cho chất cấy vào môi trường. Đồng nhất hóa vừa đủ huyền phù đã chuẩn bị.
- Chỉ sử dụng MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose được sản xuất bởi Bruker Daltonics GmbH & Co. KG.
- MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose phải được bảo quản ở 2–25°C và AST-Reagent Kit ở 2–8°C.
- Nếu MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose được bảo quản trong tủ lạnh, hãy làm nóng môi trường trong tủ ấm trước khi sử dụng, xem phần 6.1 và 7.1.
- Cấy đĩa thạch Sabouraud glucose (dextrose) (4%) (không có phụ gia) với huyền phù nấm men hoặc huyền phù *Cryptococcus* spp. để kiểm soát độ tinh khiết.
- Tuân theo nhiệt độ ủ và thời gian ủ đã chỉ định.

9 Kiểm soát chất lượng

Các đĩa xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC và thuốc thử phải qua nhiều đợt kiểm tra chất lượng, được thực hiện một cách có hệ thống trong các giai đoạn sản xuất khác nhau. Kiểm soát chất lượng vi nấm có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các chủng sau:

Chủng	Số ATCC ¹	Số DSMZ ²
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	DSM 6128
<i>Candida parapsilosis</i> ³	ATCC 22019	DSM 5784

Khi đánh giá các chủng đối chứng, giá trị MIC phải nằm trong phạm vi kiểm soát chất lượng của tác nhân kháng nấm tương ứng đã được thử nghiệm trong tiêu chuẩn EUCAST hoặc của Bruker Daltonics GmbH & Co. KG. Chúng có thể được tìm thấy trong chứng nhận phân tích theo lô cụ thể. Nếu các chủng kiểm soát chất lượng được sử dụng để thử nghiệm ngay sau khi cấy từ môi trường nuôi cấy lạnh và cấy chuyển, thì việc nuôi cấy tương ứng trên thạch Sabouraud glucose (dextrose) (4%) (không có phụ gia) là đủ.

Để bảo quản các chủng kiểm soát chất lượng trong thời gian dài (tối đa 4 tuần trong tủ lạnh ở 2–8°C), các chủng này phải được cấy trên thạch potato dextrose. Để sử dụng trong xét nghiệm, các chủng phải được nuôi cấy trên thạch Sabouraud glucose (dextrose) (4%) (không có phụ gia). Bảo quản các chủng kiểm soát chất lượng trên thạch Sabouraud glucose (dextrose) (4%) (không có phụ gia) không được khuyến cáo, vì trái ngược với các chủng phân lập lâm sàng, giá trị MIC tăng cao có thể xảy ra đối với xét nghiệm tính nhạy cảm.

¹ATCC = American Type Culture Collection (Bộ Sưu Tập Chủng Cấy Hoa Kỳ)

²DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Bộ Sưu Tập Vi Sinh Vật và Nuôi Cấy Tế Bào Của Đức)

³Chỉ thử nghiệm với AST-Indicator (không có dung dịch xanh Methylene)

10 Dữ liệu lâm sàng và hiệu năng phân tích

Các yêu cầu chung của ISO 20776-1 ff. và/hoặc EUCAST áp dụng.

Là một phần của đánh giá hiệu năng lâm sàng, có tổng cộng tám nghiên cứu với 1,625 chủng phân lập lâm sàng đã được đánh giá, trong đó hệ thống xét nghiệm MICRONAUT-AM được thử nghiệm dựa trên các phương pháp tham chiếu như được mô tả bởi EUCAST và CLSI. Ở đây, đã đạt được độ đồng thuận tổng thể > 90%, cũng như các độ đồng thuận chủ yếu là 99% đối với anidulafungin, 100% đối với amphotericin B, 90% đối với voriconazole và 87% đối với itraconazole. Các giá trị đồng thuận phân loại tương ứng là 100%, 96%, 97% và 99%.

Theo các thông số kỹ thuật của tiêu chuẩn ISO 20776-2, hiệu năng của một sản phẩm cho xét nghiệm tính nhạy cảm với thuốc kháng sinh được đưa ra nếu, một mặt, ít nhất 95% giá trị MIC của kháng sinh liên quan đến chủng thử nghiệm nằm trong phạm vi kiểm soát chất lượng tương ứng hoặc phản ánh kiểu hình kháng thuốc tương ứng và mặt khác, các giá trị MIC của kháng sinh sai lệch so với giá trị phương thức MIC được tính toán (hoặc phạm vi phương thức MIC) tối đa là +/- một bước pha loãng. Sản phẩm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC có độ lặp lại 100% và độ tái lập từ 98.1% đến 100% và do đó đáp ứng các yêu cầu của ISO 20776-2 đối với sản phẩm AST trong điều khoản về độ chụm.

11 Bảo hành

Dữ liệu hiệu năng của đĩa xét nghiệm MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC được xác định trên cơ sở các hướng dẫn sử dụng này. Sự sai lệch và những thay đổi đối với quy trình xét nghiệm có thể ảnh hưởng đến chất lượng của kết quả. Bất kỳ yêu cầu bồi thường thiệt hại đều bị loại trừ trong trường hợp này.












Xin lưu ý rằng tất cả các sự cố nghiêm trọng liên quan đến sản phẩm này phải được báo cáo cho nhà sản xuất và cơ quan có thẩm quyền của quốc gia thành viên EU mà người sử dụng đang cư trú.

12 Giới hạn

Đối với việc nuôi cấy để xét nghiệm tính nhạy cảm của nấm men và *Cryptococcus* spp., luôn sử dụng thạch Sabouraud glucose (dextrose) (4%) (không có phụ gia). Nồng độ glucose cao hơn cũng như các loại đường bổ sung khác có thể dẫn đến tăng giá trị MIC.

Để xác định các giá trị MIC hợp lệ bằng cách sử dụng hệ thống xét nghiệm, phải sử dụng môi trường MICRONAUT-RPMI-1640 Medium + MOPS + Glucose do Bruker Daltonics GmbH & Co. KG sản xuất.

13 Định nghĩa của các biểu tượng

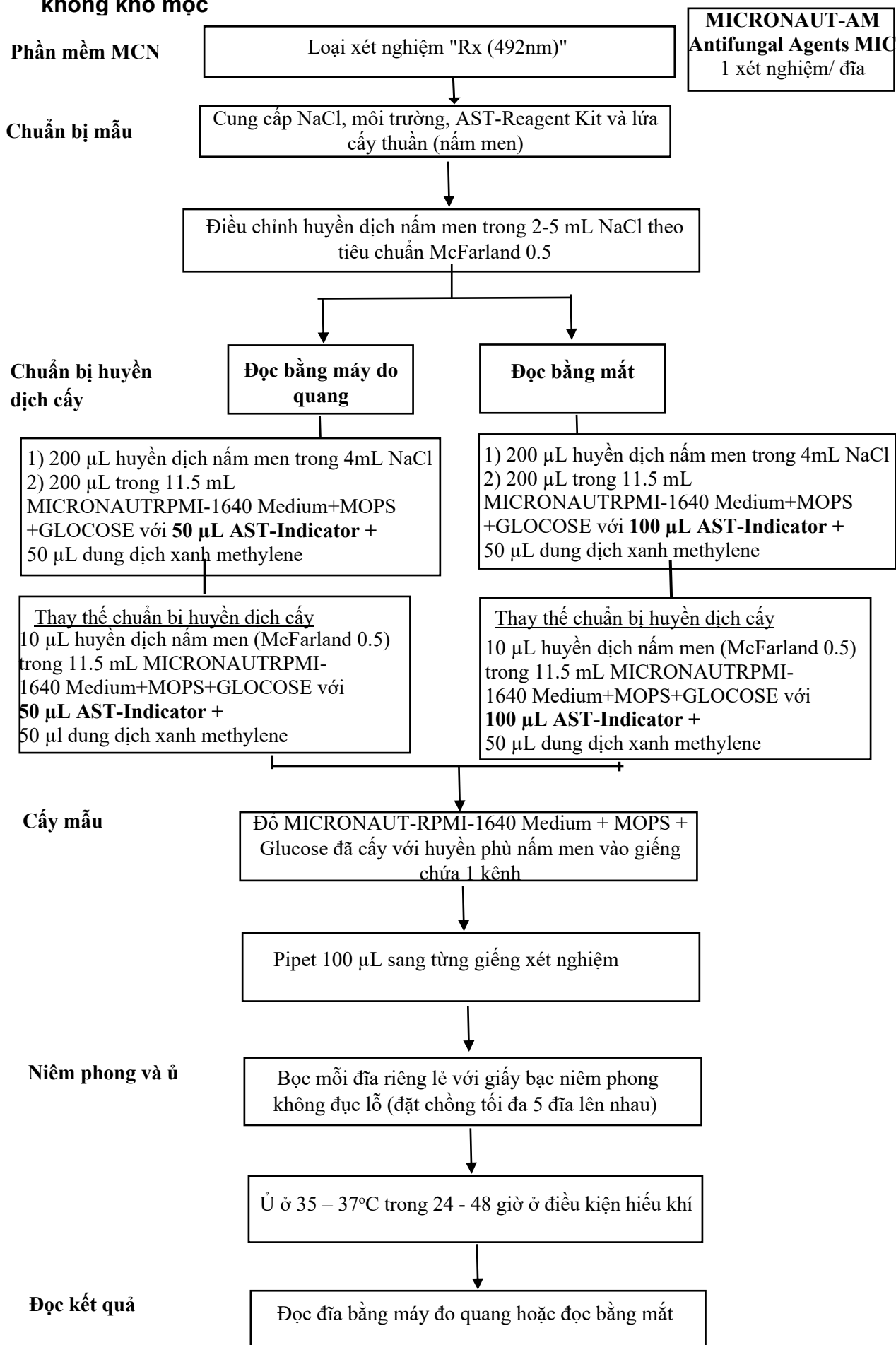
Biểu tượng	Mô tả
	Không tái sử dụng
	Có đủ cho <n> xét nghiệm
	Giới hạn nhiệt độ
	Hướng dẫn sử dụng
	Thận trọng
	Hạn sử dụng
	Dấu CE phù hợp với 98/79/EC (IVDD)
	Số lô
	Thiết bị y tế chẩn đoán <i>In-vitro</i>
	Mã sản phẩm
	Chủ sở hữu

14 Tài liệu tham khảo

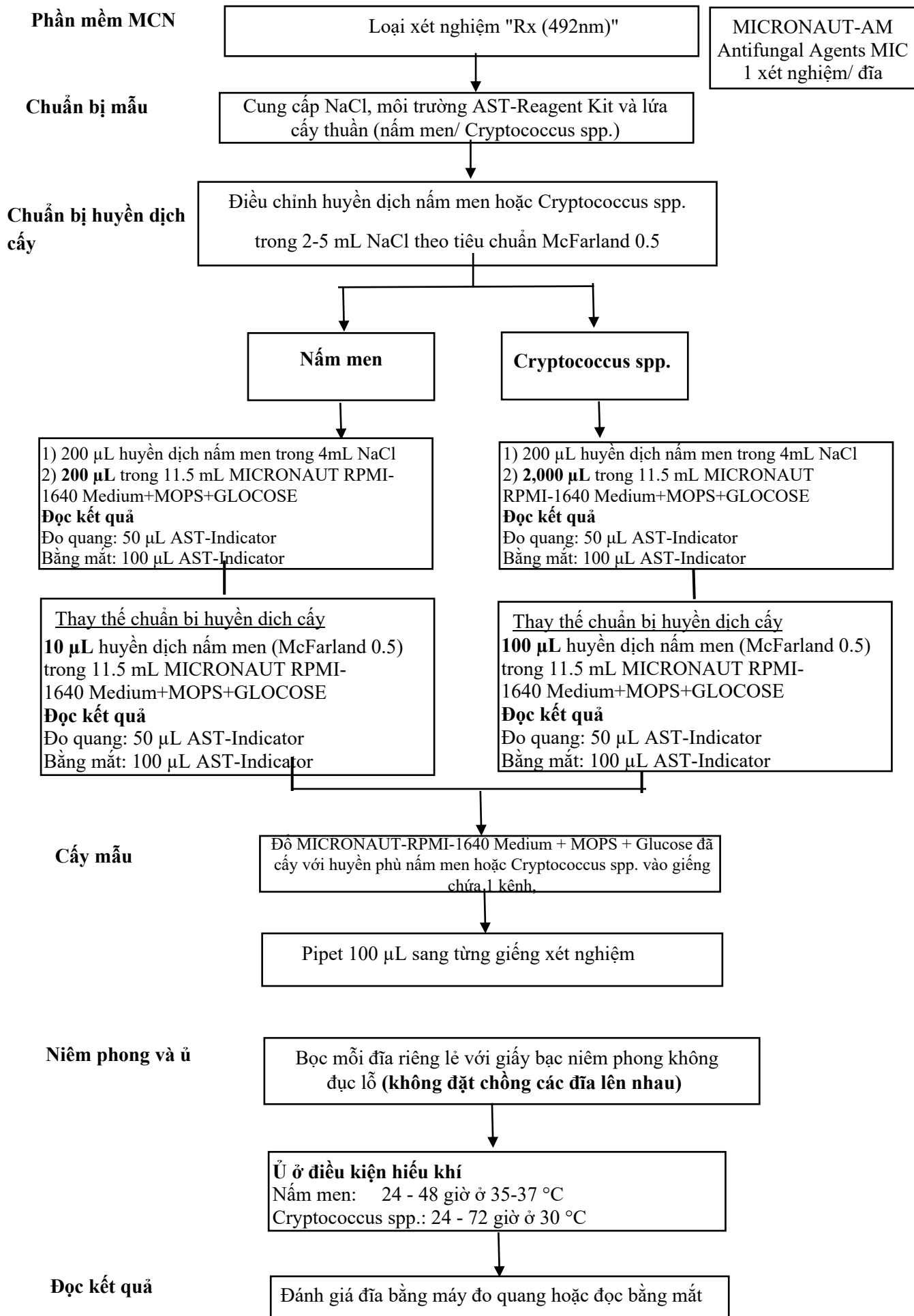
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Routine and extended internal quality control for antifungal susceptibility as recommended by EUCAST.¹
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antifungal Agents. Breakpoint tables for interpretation of MICs.¹
- Dermoumi H.: In vitro susceptibility of fungal isolates of clinically important specimens to itraconazole, fluconazole and amphotericin B, *Chemotherapy* 40 (1994); 92–98.
- Schmalreck A.F., Hotzel H.: Fourier Transform Infrarot Spektroskopie, molekularbiologische Methoden und Antimykotika-Empfindlichkeitsmuster zur Identifizierung und Differenzierung von *Cryptococcus*-Spezies. *Mycoses* 43 (2000).
- Rex J.H., Pfaller M.A., Walsh T.J.: Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and current Challenges. *Clin. Microbiology Review* Oct.2001, p. 643–658.
- Arthington-Skaggs B.A. et al.: Comparison of Visual and Spectrophotometric Methods of Broth Micro-dilution MIC End Point Determination and Evaluation of a Sterol Quantitation Method for In Vitro Susceptibility Testing of Fluconazole and Itraconazole against Trailing and Nontrailing *Candida* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Aug. 2002, p. 2477–2481.
- Pfaller M.A. and Diekema D.J.: Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin. Microbiology Review* Jan. 2007, p. 133–163.

¹Được cập nhật theo thời gian

15 Hướng dẫn tóm tắt cho MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC cho nấm men không khó mọc



16 Hướng dẫn tóm tắt cho MICRONAUT-AM Antifungal Agents MIC cho nấm men khó mọc và *Cryptococcus*



17 Chủ sở hữu

**Bruker Daltonics GmbH & Co. KG**

Fahrenheitstraße 4

28359 Bremen

Đức

Điện thoại: +49 421 2205-0

E-mail: micronaut.support@bruker.comTrang web: www.bruker.com/microbiology**Cho khách hàng tại Úc:****Bruker Pty. Ltd.**

1/28a Albert Street

Preston

Victoria 3072

Úc

Hỗ trợ (phần cứng và phần mềm):Email: biotyper.anz@bruker.com

Điện thoại: +61 (1800) 171-247

Bán hàng:Email: sales.anz@bruker.com

Điện thoại: +61 (1800) 278-537

Fax: +61 (03) 9474-7070

Mô tả và thông số kỹ thuật thay thế tất cả thông tin trước đó.

© Bản quyền 2021 Bruker Daltonics GmbH & Co. KG