

Rzeszów, dnia 11.04.2022r.

Odpowiedzi na pytania IV Wykonawca

Dotyczy: Zapytania ofertowego „Sukcesywna dostawa odczynników chemicznych, materiałów mikrobiologicznych i pomocniczych materiałów laboratoryjnych dla Wojewódzkiej Stacji Sanitarно- Epidemiologicznej w Rzeszowie”

Znak sprawy: SA.2615.1.14.2022

Wojewódzka Stacja Sanitarно- Epidemiologiczna w Rzeszowie, przekazuje odpowiedzi na pytania Wykonawcy, które wpłynęły do Zamawiającego w dniu 08.04.2022 r. i dotyczyły zapisów Zapytania ofertowego i jego załączników:

Pytanie 1

Dotyczy: Pakiet nr 4- Testy do aparatu LisaScan, materiały pomocnicze:

Czy w związku z wycofaniem z produkcji testu CANDIDAtest 21 (pozycja 10), Zamawiający dopuści zaoferowanie testu zgodnego z załączoną metodyką?

Odpowiedź:

Zamawiający wyraża zgodę na powyższe.

DYREKTOR
dr inż. Adam Sidor

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 nieużytej 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% agarą bez dodatków, agarą 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 mikrobiałnej zawiesinę o gęstości 3 McFarlanda (zawiesinę należy dokładnie zhomogenizować za pomocą vortexu)

Sprawdzenie czystości inokulum:

- W celu sprawdzenia czystości inokulum należy przeprowadzić tą samą eż, 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 nieużyte studzienki z pierwszej pełnej ramki, ułożyć luzem w torebce do przechowywania a ramkę tej pierwszej płytki wykorzystać do inkubacji.
- Resztę nieużytej płytki z pochłaniaczem wilgoci należy włożyć do torebki przeznaczonej do ułożenia nieużytej 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 ciepłarni 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 powstać 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 artrokonidii. Artrokonidia 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
Candida albicans CCM 8261								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	-	+	+	-	+	v	-	+
Cryptococcus neoformans CCM 8312								
1	URE	SUC	MLT	LAC	GAL	TRE	CEL	PRO
	+	-	-	-	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae CCM 5852								
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
<i>Candida albicans</i>	-	+	+	-	+	+	-	+
<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	-	+	-	-	+	v	(-)	+
<i>Candida kefyr</i>	-	+	-	(+)	+	-	v	-
<i>Candida krusei</i>	-	-	-	-	(-)	-	-	(-)
<i>Candida lipolytica</i>	(+)	-	-	-	(-)	-	-	+
<i>Candida lusitanae</i>	-	+	(+)	-	v	v	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>	-	+	v	-	+	v	-	+
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	v	(-)	-	v	(-)	(-)	-
<i>Geotrichum sp.</i>	-	-	-	-	v	-	-	(-)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+	(+)	-	v	v	-	-
<i>Trichosporon sp.</i>	(+)	-	-	-	-	-	-	(-)

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.