FUNGIFAST® AFG

Determinación de la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos

12 pruebas (Ref. 44412)

CPB 0308_ES-2016-04_

Solo para diagnóstico in vitro, exclusivamente para uso profesional.

CE

1 – OBJETIVO

El kit FUNGIFAST AFG permite determinar la sensibilidad de las levaduras más frecuentes en la patología humana a diversos antifúngicos utilizados para tratar micosis superficiales o profundas.

2 – INTRODUCCIÓN

El aumento de la frecuencia de las infecciones fúngicas nosocomiales o comunitarias, la aparición de resistencia a los antifúngicos habitualmente utilizados, así como la comercialización de nuevas moléculas, hacen necesario evaluar el comportamiento de las levaduras frente a los antifúngicos.

Las técnicas de referencia del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) o del EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing) para las pruebas de sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos son métodos demasiado complejos para su uso rutinario.

La prueba FUNGIFAST AFG utiliza un método colorimétrico en microdilución en fase líquida. Es rápida, fácil de utilizar, de fácil interpretación y apta para todos los laboratorios de análisis. Además, presenta una buena correlación con los métodos de referencia.

3 – PRINCIPIO

La determinación de la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos se basa en el crecimiento o no de estas levaduras en presencia de diferentes antifúngicos presentes en tres o cuatro concentraciones.

Este crecimiento en medio líquido se visualiza mediante un cambio de color del medio. La fermentación de la glucosa por parte de las levaduras provoca una reducción del indicador redox, lo que hace que el medio pase de un color violeta oscuro a rosa o incoloro.

Los resultados se interpretan tras 24 horas de incubación, en cuanto se produce el cambio de color en el medio del pocillo de control positivo de crecimiento (C+). El pocillo correspondiente, sin antifúngico, se inocula con el medio MES FUNGI sembrado.

La ausencia de cambio de color en el medio del pocillo de control negativo (C-) permite comparar fácilmente el cambio de color en los demás pocillos. El pocillo correspondiente, sin antifúngico, se inocula con el medio MES FUNGI sin siembrar.

4 – REACTIVOS

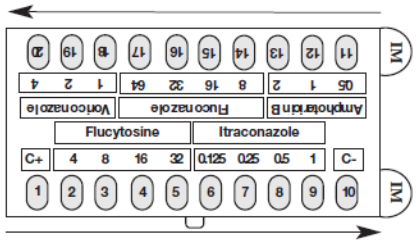
Descripción	Cantidad
SUSPENSION FUNGI : Frasco de 4 mL de medio semigelificado tamponado para la suspensión de colonias y la estandarización; contiene Bacto Agar, colimicina y vancomicina.	**14**
MES FUNGI : Frasco de 5 mL de medio líquido para el estudio de la sensibilidad (medio RPMI modificado) que contiene resazurina como indicador de crecimiento y glucosa.	**12**
TC FUNGI : Frasco de 4 mL de sulfato de bario para el control de estandarización del inóculo.	**1**
FUNGIFAST AFG : Placa de 20 pocillos, para una prueba, envasada individualmente en una bolsa de aluminio.	**12**

Composición de la galería

La placa FUNGIFAST AFG contiene diferentes antifúngicos en las siguientes concentraciones:

1 pocillo (C+): (0 µl/mL)	11 pocillo (AB): (0,5 µl/mL)
2 pocillo (5FC): (4 µl/mL)	12 pocillo (AB): (1 µl/mL)
3 pocillo (5FC): (8 µl/mL)	13 pocillo (AB): (2 µl/mL)
4 pocillo (5FC): (16 µl/mL)	14 pocillo (FCZ): (8 µl/mL)
5 pocillo (5FC): (32 µl/mL)	15 pocillo (FCZ): (16 µl/mL)
6 pocillo (ITZ): (0,125 µl/mL)	16 pocillo (FCZ): (32 µl/mL)
7 pocillo (ITZ): (0,25 µl/mL)	17 pocillo (FCZ): (64 µl/mL)
8 pocillo (ITZ): (0,5 µl/mL)	18 pocillo (VRZ): (1 µl/mL)
9 pocillo (ITZ): (1 µl/mL)	19 pocillo (VRZ): (2 µl/mL)
10 pocillo (C-): (0 µl/mL)	20 pocillo (VRZ): (4 µl/mL)

Principio activo	Abreviatura	Denominación comercial
Anfotericina B	AB	FUNGIZONE (convencional) ABELCET, AMBISONE (liposomales)
Flucitosina	5FC	ANCOTIL
Fluconazol	FCZ	TRIFLUCAN
Itraconazol	ITZ	SPORANOX
Voriconazol	VOR	VFEND



5 – PRECAUCIONES

• Los reactivos de este kit están destinados al diagnóstico in vitro y deben ser manipulados por personal autorizado.

• Las muestras y los reactivos contaminados son potencialmente infecciosos, por lo que deben manipularse con las precauciones habituales, respetando las normas de higiene y la normativa vigente en el país de uso para este tipo de producto.

• Las tiras contienen sustancias peligrosas y deben manipularse con precaución (para más información, consulte la ficha de datos de seguridad).

• No utilice los reactivos una vez superada la fecha de caducidad.

• No utilice reactivos dañados o que no se hayan conservado correctamente antes de su uso.

6 – TOMA DE MUESTRAS

La determinación de la sensibilidad debe realizarse a partir de colonias jóvenes, de 24 horas como máximo tras el aislamiento, y perfectamente aisladas a 37 °C (o a 30 °C para *Cryptococcus neoformans*) en un medio gelificado, preferiblemente en una placa de Petri. Se recomienda realizar el aislamiento en medios específicos para levaduras. Se recomiendan el medio Sabouraud o el agar cromogénico CANDICHROM II de ELITech MICROBIO (Ref. 44211 o Ref. 44212).

7 – CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos conservados a 2-8 °C en su envase original son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el estuche.

Los reactivos están listos para su uso y deben utilizarse inmediatamente después de su apertura.

8 – REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

• Aceite de parafina
• Pipetas PASTEUR estériles / Pipetas de 10 µL y 100 µL
• Estufa a 37 °C y 30 °C (solo para *Cryptococcus*)
• Recipiente para residuos contaminados

9 – PROCEDIMIENTO

Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.

9.1. Preparación del inóculo

Seleccionar dos o tres colonias aisladas idénticas con una pipeta de Pasteur tapada. A continuación, verterlas en un medio SUSPENSION FUNGI. Homogeneizar.

La estandarización del inóculo puede realizarse de diferentes maneras:

Con un densímetro:

Compruebe con un densímetro que la turbidez del medio de suspensión inoculado sea igual a 2 Mac Farland. Si es necesario, proceda como se ha indicado anteriormente para ajustar la turbidez.

En relación con el frasco TC FUNGI:

Ajuste la opacidad del medio SUSPENSION FUNGI inoculado a la del TC FUNGI utilizando como referencia las líneas negras de las etiquetas de los frascos. Si el medio de suspensión es más claro (inóculo insuficiente), vuelva a inocular el frasco hasta obtener una opacidad igual a la del frasco de control. Si el medio de suspensión es más turbio (inóculo demasiado rico), diluir con un nuevo frasco de SUSPENSION FUNGI hasta obtener una opacidad correcto.

Recuento en célula de Malassez:

Es posible estandarizar el inóculo realizando un recuento de levaduras en la célula de Malassez. Se debe obtener una suspensión de entre 10^6 y 10^7 levaduras por ml.

9.2. Inoculación de la galería de control negativo

Identificar correctamente una galería FUNGIFAST AFG.

Despegar la etiqueta adhesiva y verter en el pocillo 10 (C-):

- 100 µL de medio MES FUNGI sin inocular,
- 2 gotas de aceite de parafina.

Inoculación del medio MES FUNGI

Inocular 10 µL de SUSPENSIÓN FUNGI inoculada previamente estandarizado (§9.1). Homogeneizar.

Inoculación de la placa

Distribuir en cada uno de los pocillos, excepto en el pocillo 10 (C-) que ya está lleno:

- 100 µL de MES FUNGI previamente inoculado,
- 2 gotas de aceite de parafina.

Volver a colocar la etiqueta adhesiva en la placa.

9.3. Incubación de la placa

Incubar la placa a 37 °C durante 24 horas; si es necesario y en función de las cepas, prolongar la incubación hasta 48 horas.

Importante: No realizar la lectura a las 18-20 horas de incubación, aunque el pocillo de control positivo haya cambiado de color, sino esperar 24 horas.

Para las cepas de *Cryptococcus neoformans*, incubar la galería a 30°C y, si es necesario, prolongar la incubación hasta 72-96 horas.

10 – LECTURA E INTERPRETACIÓN

Un cambio de color del medio, inicialmente de color violeta oscuro, a rosa o incoloro, indica la capacidad de la cepa para desarrollarse a la concentración de antifúngico analizada.
Por el contrario, la ausencia de cambio de color del medio indica que la cepa ha sido inhibida a la concentración del antifúngico analizada.

10.1. Validación (pocillo de control positivo C+)

Comprueba que el medio correspondiente al control de crecimiento (C+) haya cambiado a rosa o a incoloro; de lo contrario, continúa con la incubación (9.3). En el caso de las cepas de *C. neoformans*, la lectura es posible en cuanto el medio del pocillo C+ haya adquirido un color violeta claro.

10.2. Control negativo de lectura (pocillo de control negativo C-)

Evaluar el cambio de color en comparación con el pocillo de control negativo 10 (C-), que presenta el color inicial del medio.

10.3. Interpretación de los resultados

Para mayor facilidad, utilice la hoja de resultados incluida en el kit. Los resultados pueden expresarse en concentración mínima inhibitoria o en categorizaciones clínicas.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI se determina como la concentración más baja en la que no se observa crecimiento visible de la bacteria (primer pocillo en el que el medio permanece de color violeta oscuro).

Clasificación clínica (S / I o S-DD / R)

La cepa se considera sensible (S), intermedia (I) / sensible dependiente de la dosis (S-DD) o resistente (R) en función de las concentraciones críticas del antifúngico descritas en la siguiente tabla:

Concentraciones críticas (µg/mL) para Candida ssp. :

	S	I	SDD	R
Amfotericina B*	ND	ND	-	ND
Flucitosina**	≤ 4	8-16	-	≥ 32
Itraconazol**	≤ 0,125	-	0,25-0,5	≥ 1
Fluconazol**	≤ 8	-	16-32	≥ 64
Voriconazol**	≤ 1	-	2	≥ 4

ND : No determinado
* En el caso de la anfotericina, una CMI > 2 µg/mL indica una probable resistencia.
** Concentraciones determinadas por el CLSI.

10.4. Observaciones

C. krusei presenta una resistencia intrínseca al fluconazol y debe considerarse sistemáticamente resistente (R) a este antifúngico.

11 – CONTROL DE CALIDAD

Para verificar la estandarización del método, se recomienda realizar un control de calidad de forma periódica utilizando las cepas de referencia *Candida albicans* ATCC 90028 y *Candida krusei* ATCC 6258. Los valores de CMI esperados se indican en la siguiente tabla:

Antifúngico analizado	*Candida albicans* ATCC 90028	*Candida krusei* ATCC 6258
	24 horas	24 horas
Amfotericina B	≤ 0,5 µg/mL	≤ 0,5µg/mL
Flucitosina	≤ 4 µg/mL	≤ 4-16 µg/mL
Itraconazol	≤ 0,125-0,5µg/mL	0,125-1µg/mL
Fluconazol	≤ 8 µg/mL	32 - ≥ 64 µg/mL
Voriconazol	≤ 1µg/mL	≤ 1µg/mL

12 – CAUSAS DE ERRORES

• Preparación del inóculo a partir de una mezcla de cultivos o con colonias aisladas de más de 24 horas.
• Incubación de la placa a más de 38 °C.
• Lectura de la placa antes de que haya transcurrido un tiempo de incubación de 24 horas (p. ej., 18-20 horas).
• Lectura de la placa sin que se haya producido un cambio de color en el pocillo de control de crecimiento.
• Lectura de la galería 24 o 48 horas después del cambio de color en el pocillo de control de crecimiento.
Y, en general, el incumplimiento de las recomendaciones del presente prospecto.

13 – LÍMITES DEL MÉTODO

• El método de determinación *in vitro* de la sensibilidad a los antifúngicos tiene un valor indicativo sobre la interacción entre el antifúngico y la levadura durante los tratamientos *in vivo*.
• En el caso del itraconazol, el fluconazol y el voriconazol, puede producirse un fenómeno de «cola», especialmente con la especie *Candida albicans*. Este fenómeno se caracteriza por un cambio de color incompleto (violeta claro) idéntico en todos los pocillos de un mismo antifúngico.

14 – RENDIMIENTO

La evaluación del rendimiento se llevó a cabo utilizando diferentes cepas (*Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. lusitaniae, C. krusei, C. kefyr, C. guilliermondii, Saccharomyces cerevisiae, Cryptococcus neoformans*) aisladas de muestras micológicas procedentes de diferentes servicios de centros hospitalarios o de laboratorios de análisis médicos privados.
El estudio comparativo se llevó a cabo en paralelo con los métodos de referencia: el método de microdilución de EUCAST (excepto para la anfotericina B) y el método E-Test de AB Biodisk. Los resultados de los porcentajes de concordancia (en CMI categorizadas) con los métodos de referencia se recogen en la tabla siguiente:

	AB	**5-FC**	**ITZ**	**FCZ**	**VRZ**	**% CA**
	ND	n = 56	n = 56	n = 56	n = 56	-
EUCAST	**ND**	**92.9 %**	**69.6 %**	**73.2 %**	**92.9 %**	**82.2 %**
	n = 100	n = 99	n = 99	n = 99	n = 100	-
E-TEST	**99 %**	**90.9 %**	**79.8 %**	**84.8 %**	**97 %**	**90.3 %**

ND : No determinado
% conc.: % de concordancia.

En cuanto al tiempo de incubación, el 93,3 % (97/104) de las cepas dieron un resultado tras 24 horas.

15 – ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

Los residuos deben eliminarse respetando las normas de higiene y la normativa vigente para este tipo de reactivos en el país de uso.

16 – BIBLIOGRAFÍA

Subcomité de Ensayos Antifúngicos del Comité Europeo de Ensayos de Sensibilidad a los Antibióticos de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas.
2002. Método para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante dilución en caldo de levaduras fermentativas. Documento de debate de EUCAST E. Dis. 7.1
ESCMID. Rex J.H., M.A. Pfaller, Walsh T.J., Chaturvedi V., Espinel-Ingroff A., Ghannoum M.A., Gosey L.L., Odds F.C., Rinaldi M.G., Sheehan D.J. y Warnock D.W. 2001. Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos: aspectos prácticos y retos actuales.
Clinical Microbiology Reviews, 14(4):643-658.

FUNGIFAST® es una marca registrada de ELITech MICROBIO.

Las modificaciones respecto a la versión anterior están resaltadas en gris.

ELITech MICROBIO
Parc d'activités du plateau
19, allée d´Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
Tel : 33 (0)4 94 88 55 00
http://elitechgroup.com