

CANDIFAST®

Тест за идентификация на дрожди и антигъбична резистентност

8 теста (Cat. N°44008) 30 теста (Cat. N°44030)

CANDIFAST® ES Twin

Тест за антигъбична резистентност
30 теста (Cat. N°44130)

BG-2009-03_CPB 0038



1 - Употреба

Теста CANDIFAST позволява идентификацията на основни човешки патогенни дрожди, както и тест за тяхната устойчивост към различни антигъбични агенти.

Теста CANDIFAST ES Twin е за употреба за тест на устойчивостта на дрожди към различни антигъбични агенти

2 - Въведение

Гъбичните инфекции и особено тези причинени от дрожди значително се увеличиха през последните 10 години (5). Дрождите са опортюнистични агенти. Повечето от тях са сапрофити, но могат да станат патогени когато условията в гостоприемника станат подходящи за това. Тези условия са главно физиологични фактори (при новородени, по - възрастни хора, бременни жени), местни фактори (раздразнения), патологични фактори (ракowi образувания, имунни дефицити, метаболитни нарушения), фактори асоциирани с терапия (антибиотици, противозачатъчни, имunosупресори, йонизиращи лъчения, хирургична намеса,...) Клиничните прояви причинени от тези дрожди доста варират: кожни, The clinical features caused by these yeasts are quite varied: кожни признаци (възпалителни раздразнения, гъбички по ноктите ...), кожно лигавични нарушения (кадидиози в устната кухина, езофагити, колити, вагинити...), висцерални условия, сепсиси. Повишеният брой достъпни антигъбични агенти и появата на резистентни микози прави много важно изследването на поведението на дрождите в присъствието на антигъбични агенти (1, 2).

3 - Принцип

Идентификация на дрождите базирана на :

- Чувствителност на тествания щам към актидион което се визуализира чрез промяна на цвета на индикатора в жълт, оранжево жълт или пурпурно;
 - Ферментация на седем захари което се визуализира чрез промяна в цвета на индикатора в жълт или оранжево жълт поради окисление на средта
 - Демонстрация на уреазна активност, което провокира алкализация на средтата, в резултат на което индикатора се променя в пурпурено.
- Определяне на резистентност на дрожди към антигъбични агенти се базира на растежа или липсата на растеж на тези дрожди в присъствието на различни антигъбични агенти. Растежа се демонстрира чрез промяна цвета на средтата :
- Ферментацията на глюкоза от дрожди води до окисление на фенол ред съдържаща среда, предизвиквайки промяна в жълро или оранжево - жълто
 - Хидролиза на уреазно – позитивни дрожди отделя амоняк, който алкализира фенол ред съдържащата среда, и я трансформира в пурпурен цвят.

4 - Реагенти

Опаковка

Реагент

	Количество	44008	44030	44130
CANDIFAST	8	30	-	-
CANDIFAST ES Twin	-	-	15	-
R1 : Шишенце реагент 1	10	35	35	-
R2 : Шишенце реагент 2	8	30	30	-
TC : Шишенце контрол на замътняването	1	1	1	-

Описание

CANDIFAST : 20 ямков плака, готова за употреба. Всякамплака позволява тестването на една проба (идентификация + тест за резистентност)

Поддредане при идентификация

Ямка 1 съдържа фенол ред, актидион (ACT) и глюкоза
Ямки 2 до 8 съдържат фенол ред и различни захари, като:
ямка 2 (GLU) : глюкоза
ямка 3 (GAL) : галактоза
ямка 4 (TRE) : трехалоза
ямка 5 (MAL) : малтоза
ямка 6 (CEL) : целобиоза
ямка 7 (RAF) : рафиноза
ямка 8 (LAC) : лактоза
ямки 9 и 10 са празни

Поддредане при тест за резистентност

Ямка 1 е контрол за растежа, (C+)
Ямка 2 до 8 съдържа различни антигъбични агенти като:
ямка 2 (AB) : амфотерцин B (4 µg/mL)
ямка 3 (NY) : нистатин (200 units/mL)
ямка 4 (FCT) : флуцитозин (35 µg/mL)
ямка 5 (ECZ) : еконазол (16 µg/mL)
ямка 6 (KTZ) : кетоконазол (16 µg/mL)
ямка 7 (MCZ) : миконазол (16 µg/mL)
ямка 8 (FCZ) : флуконазол (16 µg/mL)
ямка 9 и 10 са празни

CANDIFAST ES Twin : 2x10-ямкова плака, готова за употреба.

Двата реда на плаката са идентични на подредането при теста за резистентност на CANDIFAST .

Всяка ямка позволява тестването на две проби (само резистентност).

R1 : 4-mL шишенце буфериран агар среда за разреждане и идентификация.
Говежди екстракт 1.3 g/L, Казеин пептон 1.8 g/L, Дрождев екстракт 0.8 g/L, Амино киселини, витамини, минерали 5.75 g/L,
Урея 20 g/L, Агар 0.52 g/L, Антибиотици 1.12 g/L. pH : 6.05 ± 0,1.

R2 : 2-mL шишенце YNB (дрождева азотна база) среда съдържаща урея и фенол ред за тестване на резистентност.
Говежди екстракт 1.3 g/L, Казеин пептон 1.8 g/L, Дрождев екстракт 0.8 g/L, Аминокиселини, Витамини, минерали 8.75 g/L,
Урея 20 g/L, Глюкоза 8.5 g/L, Фенол ред 0.052 g/L, Антибиотици 1.16 g/L. pH: 7.3 ± 0,1.

TC: 4-mL шишенце разтвор на Бариев Сулфат.

5- Предпазни мерки

- Реагентите са предназначени единствено за *in vitro* употреба и трябва да се пипа само от оторизиран персонал.
- Пробите и инокулираните реагенти са потенциално инфекциозни; трябва да се пипат внимателно, да се съблюдават хигиенните правила и текущите регулации за такъв тип продукти в съответната страна.
- Към реагенти съдържащи суров материал от животински произход трябва да се подхожда с особено внимание.
- Не използвайте реагентите след изтичане срока на годност.
- Не използвайте реагентите които са повредени или са били съхранявани при неподходящи условия

6- Събиране на материал

Колониите използвани за извършване на идентификация и теста за резистентност трябва да са млади (24 до 48 часа) и перфектно изолирани на стайна температура или на 37 °C на среда с агар, за предпочитане в петри. Препоръчва се изолирането да се прави на среда специфична за дрожди (3).

7 Съхранение на реагентите

Китът и съдържанието му при съхранение на 2-8 °C в оригиналната си опаковка са стабилни до изтичане на датата указана върху опаковката. Половината от CANDIFAST ES Twin може да се съхранява на 2 to 8 °C за 7 дни, в оригиналната си опаковка, запечатана със сорбент.

8 – Необходими реагенти и материали които не са осигурени

- Парафиново олио
- Старилни пипети
- Инкубатор на 37 °C
- Контейнер за замърсен отпадък

9 – Процедура

Позволете на реагентите да достигнат стайна температура (18-25 °C) преди употреба

9.1 – Подготовка на инокулума

Вземете и изолирайте колония с йозе или Пастърка. Инокулирайте шишенцето с Реагент 1 с колонията. Разбъркайте добре. Стандартизацията на инокулума може да се извърши по 3 различни начина:

• Чрез шишенцето с контрол на замътняването

Нагласете точната мътност на инокулирания Реагент1 към тази на контролната епруветка с помощта на черните линии.

Ако реагент 1 е по – светъл (недостатъчно инокулум) инокулирайте шишенцето още докато помътняването се изравни с това на контролното шишенце

Ако реагент 1 е по-замътнен (твърде богат инокулум) разрежете с реагент 1 от друг прясно отворено шишенце докато получите точното замътване

• С денситометър

Потвърдете с денситометър че мътността на инокулирания Реагент 1 е равна на 1 Mac Farland. Ако е необходимо, направете и горната стъпка за нагласяне на мътността.

• Изброяване на Malassez Клетка

Възможно е да стандартизирате инокулума чрез преброяване на дрождите в Malassez клетка. Трябва да се получи разтвор с 2,500 до 3,500 дрожди на mm³

9.2a. Инокулация на плаката на CANDIFAST

Идентификационен ред

Маркирайте тест плаката за идентифицирате пробите които ще тествате. Повдигнете лепливата лента и добавете във всяка от първите 8 ямки:

-100 µL инокулиран стандартизиран Реагент 1

-2 капки парафиново олио

Запечатайте отново плаката с лепливата лента.

Ред за тест на резистентност

Първо инокулирайте Реагент 2 със 100 µL от инокулирания стандартизиран Реагент 1 (виж § 9.1). После повдигнете лепливата лента и добавете във всяка от първите 8 ямки:

-100 µL инокулиран Реагент 2

-2 капки парафиново олио

Запечатайте отново плаката с лепливата лента.

9.2b. Инокулация на плаката CANDIFAST ES Twin

Първи ред за проби

Инокулирайте Реагент 2 със 100 µL от инокулирания стандартизиран Реагент 1. Надпишете двата реда на плаката.

Повдигнете лепливата лента и добавете във всяка от първите 8 ямки:

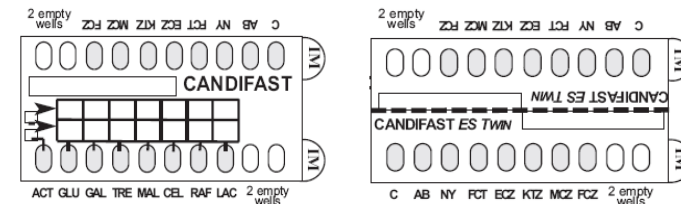
-100 µL инокулиран Реагент 2

-2 капки парафиново олио

Запечатайте отново плаката с лепливата лента.

Втори ред за проби

Инокулирайте по същия начин втория ред с едно допълнително шише от инокулиран Реагент 2 както е посочено по - горе. Запечатайте отново плаката с лепливата лента



9.3. Инкубация

Инкубирайте плаката на 37 °C за 24 hours; ако е необходимо и в зависимост от щамовете инкубацията може да се удължи до 48 или дори 72 часа. Плаката се отчита когато дрождевата колония в контролната ямка прорасне.

10 – Отчитане и интерпретация

Отчетете цялата тестова плака само ако контролната ямка (C+ : Ямка 1 на реда за тетс на резистентност) показва следната промяна в цвета на средата:

-Промяна на цвета в жълто, оранжево жълто или пурпурно*
(*за уреаса позитивни родове)

10.1 Идентификационен ред

Ямка 1 (ACT)

Параметъра е положителен когато се наблюдава промяна в цвета на средата:

-Промяна на цвета в жълто, оранжево жълто или пурпурно

Параметъра е отрицателен когато не се наблюдава промяна в цвета в жълто, оранжево жълто или пурпурно .

Ямки 2 до 8 (GLU to RAF)

Параметъра е положителен когато се наблюдава промяна в цвета на средата:

-Промяна на цвета в жълто, оранжево жълто или пурпурно

Параметъра е отрицателен когато не се наблюдава промяна в цвета в жълто, оранжево жълто или пурпурно.

Идентификация на дрожди се осъществява чрез плака CANDIFAST паралелно с морфологичен анализ на колонииите.

За интерпретация вижте таблицата по долу или тази в кита. Маркировките върху лепливата лента също могат да се използват: **първо отчетете ямката с актидион; после, отбележете последната позитивна ямка от дясно на актидионовата. Името на вида е изписано на лепливата лента в пресечната точка с актидион – позитивната (долния ред) или актидион – негативната (горен ред) характеристика и определената захар.**

	ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	v	+	-	-	-
<i>Candida albicans (var stellatoidea)</i>	+	+	-	v	+	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	v	+	-	+	-	-	-	-
<i>Candida kefyr</i>	+	+	+	-	-	-	v	+
<i>Candida krusei</i>	v	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida lusitanae</i>	-	+	+	+	v	+	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	+	+	-	v	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Saccharomyces</i>	-	+	+	v	v	v	+	-
<i>Cryptococcus</i> or <i>Trichosporon</i> or <i>Rhodotorula</i> genera			v			URE	+	

•Разграничителна диагноза

Cryptococcus, *Trichosporon* и *Rhodotorula* могат да се различат чрез морфологичен анализ.

-*Rhodotorula* са характерни с отграничителното оранжево – червено оцветяване на колонииите, растящи на Сабура агар с декстроза.

-Някои *Cryptococcus* също продуцират червеникаво оцветяване на колонииите. Следователно, *Cryptococcus* трябва да се разглежда за присъствието на капсула с приготвяне на мастило.

-*Trichosporon* произвеждат псевдохифи когато растат на PCB агар.

•Забележка

•Между родовете *Saccharomyces* , *Saccharomyces cerevisiae* е основнияпаточен за човека.

•Щамове от *Saccharomyces boulardii* или *Saccharomyces cerevisiae* могат да се изолират от пациенти лекувани на базата на дрожди.

•Микроскопски анализ може да диференцира 2 вида:

-*S. cerevisiae* са големи закръглени дрожди.

-*S. boulardii* са по-малки, с яйцеподобна форма или издължени.

•С CANDIFAST теста някои щамове *Cryptococcus* могат да растат в присъствието на актидион.

10.2 Ред за тест на резистентност

Ямки 2 до 8 (AB to FCZ)

Промяна в цвета на средата към жълто, оранжево – жълто или пурпурно индикира че щама който се тества е способен да расте в тази ямка и следователно е резистентен към антигъбичния препарат.

Ако ямките остават оранжево – червени растежа на тествания щам се инхибира от антигъбичния препарат в тази ямка.

11-Контрол на качеството

Препоръчва се стандартизацията да се проверява от време на време чрез контролни щамове, *Candida albicans* ATCC 90029 и *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Щам	Инкубация	Очаквани резултати							
<i>C.albicans</i> (ATCC 90029)	24 hours	ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC
		+	+	-	+	-	-	-	-
	C+	AB	NY	FCT	ECZ	KTZ	MCZ	FCZ	
		+	-	+	-	-	-	-	
<i>C.parapsilosis</i> (ATCC 22019)	48 hours	ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC
		-	+	+	-	-	-	-	-
	C+	AB	NY	FCT	ECZ	KTZ	MCZ	FCZ	
		+	-	-	-	-	-	-	

12- Причина за грешки

•Приготвеният инокулум е твърде концентриран или недостатъчно концентриран.

•Приготвяне на инокулум със смесена култура или с изолирани колонии расли повече от 48 часа.

•Плаката се отчита преди поява на промяна в цвета на индикатора за растеж.

•Плаката не се отчита след инкубация 24 или 48 часа , въпреки че индикатора за растеж е положителен.

Като цяло не вземането под внимание на препоръките относно процедурата.

13-Ограничения

•Този *in vitro* метод за определяне на резистентност към антигъбични агенти има показателна стойност за взаимодействията антигъбичен агент – дрожди *in vivo* (2,4).

•CANDIFAST процедурата е насочена към идентификация и тестване резистентността на антигъбични агенти само за дрожди с кожно лигавичен произход . Следователно не бива да се използва за дрождени щамове от системни микози.

•CANDIFAST не позволява категоризацията Чувствителен – Междинен - Резистентен.

•Някои термочувствителни щамове изолирани на 20 °C растат различно на 37 °C. В този случай дрождата или няма да расте или ще расте много слабо. Кате следствие може да е много трудно, или невъзможно, да се даде сигурна идентификация на щама или да се оцени тяхната антигъбична резистентност.

•За определени щамове *C. lusitanae* забяване в растежа в TRE ямката прави идентификацията с приложената таблица трудно. Идентификация може да се получи и чрез маркировката на лепливата лента на плаката

•Интерпретацията на резистентността не взема под внимание замъгляване на средата което може да се появя след инкубация с азолни антигъбични агенти.

14-Изпълнение

Щамове

Прочуването се проведе с 80 събрани щама (31 *Candida albicans*, 17 *C. glabrata*, 11 *C. tropicalis*, 6 *C. lusitanae*, 3 *C. parapsilosis*, 2 *C. kefyr*, 2 *C. krusei*, 5 *Saccharomyces spp.*, 2 *Cryptococcus neoformans* and 1 *Trichosporon cutaneum*).

78 щама бяха коректно идентифицирани с помощта на маркировката на лепливата лента на плаката, и дадоха 97.5% съответствие с ELITech MICROBIO FUNGICHROM метода и Biomérieux API 32C метода. Общото съответствие на теста за резистентност сравнен с Biorad FUNGITEST и Biomérieux AT B Fungus тестовете, е 87.4%.

Клинични щамове

Прочуването беше направено със 100 свежо изолирани щама от клинични проби взети от пациенти (72 *Candida albicans*, 9 *C. glabrata*, 8 *C. parapsilosis*, 5 *C. tropicalis*, 3 *C. krusei*, 1 *C. kefyr*, 1 *C. inconspicua* and 1 *Saccharomyces spp.*).

98 щама бяха правилно идентифицирани след сравнение с Biomérieux VITEK метода.

Общото съответствие на теста за резистентност сравнен с Biorad FUNGITEST и Biomérieux AT B Fungus тестовете, е 98,5%. Между 10 несъответствия, 3 са основни грешки и 7 са минимални. Тези несъответствия се отнасят до 4 щама (2 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* и 1 *C. tropicalis*) и 3 антигъбични агента : econazole (2 R/I и 1 R/S), ketoconazole (1 R/I and 2 R/S) и miconazole (4 R/I).

15 - Извървяне на изработената плака

Трябва да се постави в съответствие с хигиенните правила и текущите регулации за този тип продукти в съответната страна.

16 - Библиография

1.DUPONT B. 1987. Résistance de *Candida* aux antifongiques. Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Chap. 4, 23-26.

2.DUPOUY-CAMET J., M.-E. BOUGNOUX, I. VICENS et C. TOURTE-SCHAEFER. 1989. Intérêts et limites de l'antifongigramme. Rev. Fr. Lab. 197: 69-72.

3.GRILLLOT R., B. LEBEAU et I. SELBMANN. 1989. Isolement et identification des levures, données récentes et perspectives. Rev. Fr. Lab. 197:24-32.

4.PAUGAM A.. 1996. Intérêt de l'étude *in vitro* de la sensibilité des levures aux antifongiques. Rev. Fr. Lab. 282: 157-159.

5. KOENIG H., J. WALLER et M. KREMER. 1989. Diagnostic et aspects épidémiologiques de 70 000 levures iso-lées en 8 ans. Rev. Fr. Lab. 197: 34-38.

CANDIFAST® е запазена марка d'ELITech MICROBIO

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du plateau

19, allée d'Athènes

83870 SIGNES

(France)

Tél: 04 94 88 55 00

Fax: 04 94 88 55 22

