

CANDIFAST

Identificación de las levaduras y test de resistencia a los antifúngicos

8 test (Ref. 44008) 30 test (Ref. 44030)

CANDIFAST ES TWIN

Test de résistance des levures aux antifongiques
30 test (Ref. 44130)

ES-2009-03



1- FINALIDAD
El estudio CANDIFAST permite identificar las principales levaduras de interés médico y testar su resistencia a diversos antifúngicos.

2- INTRODUCCION

La llegada de las infecciones fúngicas y en particular a de las provocadas por levaduras ha aumentado considerablemente a lo largo de los últimos años (5). Las levaduras son agentes oportunistas. La mayoría son saprofitas, pero pueden convertirse en patógenas cuando existen en las más propicias condiciones favorables.
Estas condiciones son principalmente: los factores psicológicos; : edad, mujeres encintas; los factores locales; : traumatismos; : mareas; : los factores patológicos; : cáncer; : insuficiencia inmunitaria; : trastornos metabólicos... Los factores iatrogénicos; : antibioprofilaxis; : pléidos antifúngicos; : inmunosupresores; : radiaciones ionizantes; cirugía... Los cuadros clínicos provocados por estas levaduras son muy variados: afeciones cutáneas (fitofitrio; onyxis...); afeciones de las mucosas (mugil; esofagitis; colitis; vaginitis...); afeciones viscerales y sistémicas.
El aumento del número de productos antifúngicos así como la proliferación de micosis resistentes a los tratamientos, justifican la evaluación del comportamiento de las levaduras frente a los antifúngicos (1,2)

3- PRINCIPIO

La identificación de la levadura se basa sobre :
- La sensibilidad o no de la cepa a la actidina, visualizada por el viraje al amarillo, o al amarillo-anaranjado, o al lúscia del indicador coloreado;
- El estudio de la fermentación de siete azúcares, visualizada por el viraje al amarillo o al amarillo-anaranjado del indicador coloreado debido a la acidificación del medio;
- La detección de una actividad ureasica que alcaliniza el medio y hace virar el indicador coloreado al fucsia.
La determinación de la resistencia de las levaduras a los antifúngicos se basa en el crecimiento o no de estas levaduras en presencia de diferentes antifúngicos. Este crecimiento se visualiza por un cambio de color del medio.
- La fermentación de la glucosa por las levaduras lleva consigo una acidificación del medio que hace virar el rojo de fenol presente en el medio del rojo anaranjado al amarillo o al amarillo-anaranjado.
- La hidrólisis de la urea por las levaduras ureasas positivas, libera amoníaco que alcaliniza el medio y hace virar el rojo de fenol del rojo anaranjado al rosa fucsia.

4- REACTIVOS

Envase
Reactivo
CANDIFAST ES TWIN
R1 : Frasco de Reactivo 1
R2 : Frasco de Reactivo 2
TC : Frasco de control de turbidez

Reactivo	#4008	#4030	#44130
CANDIFAST ES TWIN	9	30	15
R1 : Frasco de Reactivo 1	10	35	35
R2 : Frasco de Reactivo 2	8	1	30
TC : Frasco de control de turbidez	1	1	1

Descripción
Galería CANDIFAST: Galería 20 pocillos, lista para su uso.
Cada galería permite testear una muestra (identificación + test de resistencia)
Serie para la identificación
El pocillo 1 contiene actidina (ACT), glucosa y rojo de fenol.
Los pocillos 2 a 8 contienen diferentes azúcares y rojo de fenol.
El pocillo 9 es un pocillo de control (C+).
Los pocillos 2 a 8 contienen diferentes antifúngicos.
El pocillo 9 es un pocillo de control (C-).
Serie para el test de resistencia
El pocillo 1 es un pocillo de control (C+).
Los pocillos 2 a 8 contienen diferentes antifúngicos.
El pocillo 9 es un pocillo de control (C-).
Los pocillos 2 (AB), actidina B (4 µg/ml),
pocillo 3 (NV), nistatina (200 unidades/ml),
pocillo 4 (FT), flucanazol (35 µg/ml),
pocillo 5 (EC), econazol (16 µg/ml),
pocillo 6 (KTZ), ketocanazol (16 µg/ml),
pocillo 7 (MZZ), micranazol (16 µg/ml),
pocillo 8 (FZZ), flucanazol (16 µg/ml).
Los pocillos 9 y 10 están vacíos

CANDIFAST ES TWIN - Galería 20 pocillos, lista para su uso.

Las series de pocillos corresponden al test de resistencia de la galería CANDIFAST.
Cada galería permite testear dos muestras (tests de resistencia únicamente).
R1 : Frasco de 4 ml de medio agarosado (anaranjado para el dilución y la identificación.
Extracto de buey, 1,3 g/L, Peptonina de caseína 1,9 g/L, Extracto de levadura 0,8 g/L, Aminoácidos, vitaminas, minerales 5,75 g/L, Urea 20 g/L, Agar 0,52 g/L, Antibióticos 1,12 g/L, pH : 6,05 ± 0,1.
R2 : Frasco de 2 ml de medio para el test de resistencia.
Extracto de buey 1,3 g/L, Peptonina de caseína 1,8 g/L, Extracto de levadura 0,8 g/L, Aminoácidos, vitaminas, minerales 8,75 g/L, Urea 20 g/L, Glucosa 8,5 g/L, Rojo de fenol 0,052 g/L, Antibióticos 1,16 g/L, pH : 7,3 ± 0,1.
TC : Frasco de 4 ml de sulfato de bario para el control de dilución.

5- PRECAUCIONES DE EMPLEO

- Los reactivos de este estudio son únicamente para uso *in vitro* por personas autorizadas.
- Las muestras y los reactivos sembrados son potencialmente infecciosos; deben ser manipulados con precauciones de uso y desecharse a continuación respetando las reglas de higiene y la reglamentación vigente para este tipo de productos en el país de utilización.
- Los reactivos, que contienen materias primas de origen animal deben ser manipulados con las precauciones de uso correspondientes.
- No utilizar los reactivos deteriorados o mal conservados antes de usar.

6- TOMA DE LAS CEPAS

- La identificación y el test de resistencia deben realizarse a partir de colonias:
 - jóvenes (24 a 48 horas)
 - perfectamente aisladas a temperatura ambiente o a 37 °C sobre un medio agarosado, de preferencia en placa de Petri. Se recomienda efectuar el aislamiento sobre medios específicos de las levaduras (3).

7- CONSERVACION DE LOS REACTIVOS

Los reactivos conservados a 2-8 °C en su estado de origen, son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el estuche. La mitad de la galería CANDIFAST ES TWIN sin utilizar puede conservarse durante 7 días a 2-8 °C en su envase original herméticamente cerrado y junto a su bolsa deshidratante.

8- REACTIVO Y MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

- Aceite de parafina
- Estufa a 37 °C
- Pipetas estériles
- Recipiente para desechos contaminados

9- PROCEDIMIENTO

- 9.1- Preparación de la inoculación**
Tomar una colonia aislada con ayuda de una Ose o de una pipeta Pasteur quemada. Después de secar la muestra en un frasco de Reactivo 1 Homogeneizar. La estandarización de la inoculación puede realizarse de diferentes formas:
 - Con relación a un frasco de control de turbidez
 - Ajustar la capacidad del Reactivo 1 sembrado a la del frasco TC de control de turbidez ayudándose de las rayas negras de las etiquetas del frasco.
- Si el Reactivo 1 es mas claro (inoculación insuficiente), resembrar el frasco hasta la obtención de una opacidad igual a la del frasco de control de turbidez. Si el Reactivo 1 es mas turbio, (inoculación demasiado rica) diluir con ayuda de un nuevo frasco de Reactivo 1 hasta la obtención de una opacidad correcta.
- Con ayuda de un deslaminador

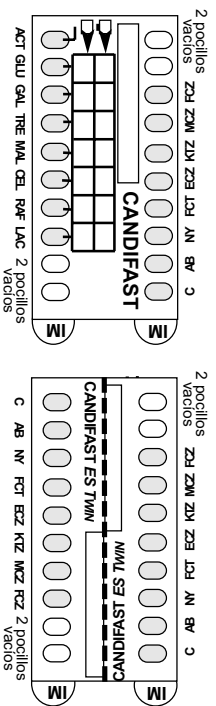
Numeração en célula de Malassez
Numeração en célula de Malassez
ES posible estandarizar la inoculación efectuando una numeración en célula de Malassez. Se debe obtener una solución de 2500 a 3500 levaduras por mm³.

9.2a. Inoculación de la galería CANDIFAST

Identificar bien la galería. Levantar el adhesivo, después distribuir en cada uno de los 8 primeros pocillos.
- 100 µL de RI sembrado y estandarizado
- 2 gotas de aceite de parafina
Cubrir la serie de pocillos con el adhesivo

Serie para el test de resistencia

En un primer fase, inocular el Reactivo 2 por 100 µL de Reactivo 1 sembrado y estandarizado (párrafo 9.1). Después en una segunda fase levantar el adhesivo y distribuir en cada uno de los 8 primeros pocillos de la serie para el test de resistencia :
- 100 µL de R2 previamente sembrado
- 2 gotas de aceite de parafina
Recubrir la serie de pocillos con el adhesivo.



9.3. Incubación

Incubar la galería a 37 °C durante 24 horas, si es necesario y según las cepas; continuar la incubación hasta 48 horas o 72 horas.

10- LECTURA E INTERPRETACION DE LA GALERIA

Leer el conjunto de la galería, únicamente si el pocillo de control (C+) de la serie para el test de resistencia) se observa un cambio de color en el medio.
- Paso al amarillo, o al amarillo-anaranjado, o al fucsia* (generos ureasas positivos)
10.1 Serie para la identificación
Pocillo 1 (ACT)
Un carácter es positivo cuando en el pocillo ACT se observa un cambio de color en el medio.
- Paso al amarillo, o al amarillo-anaranjado, o al fucsia*
Un carácter negativo se traduce por una ausencia de cambio de color al amarillo, o al amarillo-anaranjado, o al fucsia.
Pocillos 2 a 8 (GLU al RAZ)
Un carácter es positivo cuando en el pocillo se observa un cambio de color en el medio.
- Paso al amarillo, o al amarillo-anaranjado, o al fucsia
Un carácter negativo se traduce por una ausencia de cambio de color al amarillo, o al amarillo-anaranjado, o al fucsia.
Pocillos 9 y 10 (GLU al RAZ)

Un carácter negativo se traduce por una ausencia de cambio de color al amarillo, o al amarillo-anaranjado, o al fucsia.
La interpretación de la levadura se realiza con ayuda de la galería y de sus caracteres morfológicos de sus colonias.
Para la interpretación, referirse al cuadro siguiente o a la hoja incluida en el estudio. Es igualmente posible auxararse de las indicaciones inscrites sobre el adhesivo de la galería; leer el pocillo actidina (ACT), después seleccionar el ultimo pocillo positivo a la derecha. El nombre del germen se indica sobre el adhesivo en la intersección del carácter positivo (la inferior) o negativo (fila superior) de la actidina y el azúcar localizados.

Levadura	ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> (var. <i>stellatoidea</i>)	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida kefyr</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida lusitanae</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Saccharomyces</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
Generos <i>Cryptococcus</i> o <i>Trichosporon</i> o <i>Rhodotulua</i>	V							

Diagnostico Diferencial

- Cryptococcus*, *Trichosporon* y las especies *Rhodotulua* podran ser diferenciadas mediante su examinación morfológica.
- La especie *Rhodotulua* origina colonias distintas con coloración anaranjado-rojo creciendo sobre el medio agar derecho de Sabouraud*.
- Algunas cepas de la especie *Cryptococcus* podran tambien producir una pigmentación rojiza, es por esto que las especies de *Cryptococcus* deberan ser examinadas para observar la presencia capsular mediante la utilización de la preparación de Italia India.
- Especies *Trichosporon* producen un crecimiento Sautchita sobre el medio agar PCB.
- Nota**
 - Entre las especies de *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae* es la principal especie patogénica en humanos.
 - Las cepas de *Saccharomyces boulardii* o *Saccharomyces cerevisiae* podran ser ablatas de pacientes bajo un tratamiento de secado de la levadura.
 - S. cerevisiae produce células levaduras
 - S. boulardii son de un tamaño menor, con apariencia de hongo o flagradas.
- Con el método CANDIFAST algunas cepas de la especie *Cryptococcus* podran crear en presencia de actidina, a la concentración analizada.

10.2 Serie para el test de resistencia

Pocillos 2 a 8 (AB al ECZ)
Un cambio de color del medio al amarillo o al amarillo-anaranjado, o al fucsia reduce la capacidad de la copa testada para desarrollarse en presencia del antifúngico. En ese caso, la cepa se ha vuelto resistente.
Por el contra, el color rojo anaranjado del medio indica que la copa se ha inhibido por el antifúngico contenido en la cúpula.

11- CONTROL DE CALIDAD

Para verificar la estandarización del método, se recomienda realizar un control de calidad en forma periódica utilizando las cepas de referencia *Candida albicans* ATCC 90029 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Cepas

Incubación	Resultados esperados													
ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC	C+	AB	FCT	ECZ	KTZ	MZZ	RZZ
C. <i>albicans</i> (ATCC 90029)	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C. <i>parapsilosis</i> (ATCC 22019)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
48 horas	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

12- CAUSAS DE ERRORES

- Preparación de un inoculo demasiado rico o demasiado débil.
- Preparación del inoculo a partir de una mezcla de cultivos a con colonias aisladas por más de 48 horas.
- Lectura de la galería en ausencia de viraje de color en el pocillo de control de crecimiento.
- Lectura de la galería 24 a 48 horas después del viraje de color en el pocillo de control de crecimiento.
- De manera general, el incumplimiento de las recomendaciones de las presentes instrucciones de uso.

13- LIMITES DEL METODO

- Este método de determinación *in vitro* de la resistencia de los antifúngicos tiene un valor indicativo sobre la interacción de la pareja antifúngico - levadura durante los tratamientos *in vivo* (24).
- El método CANDIFAST se ha desarrollado para detectar la resistencia de cepas de origen cutáneo-mucosas, no se recomienda por tanto para cepas aisladas de mucosas sistémicas.
- El método CANDIFAST no permite una distinción en Sensible-Inherente-Resistente.
- Cepas termotolerantes aisladas a 20°C crecen de una forma diferente a 37°C, en este caso, o bien las levaduras no crecen o crecen mal y la resistencia a ciertos antifúngicos no se podrá detectar.
- Para ciertas cepas de C. lusitanae un ensayo de crecimiento en el pocillo TRE no permite la identificación por medio de la lectura de la tabla. Tener en cuenta la lectura de la etiqueta.
- Para ciertas cepas de C. glabrata la dificultad de lectura del carácter GAL no permite la identificación por la tabla. Tener en cuenta la lectura de la etiqueta.
- La interpretación de la lectura de los tests de resistencia no debe tener en cuenta la turbidez: en los antifúngicos azolados puede aparecer una película o velo tras la incubación.

14- REFERENCIAS

En cepas de coleccion
El estudio fue realizado sobre 80 cepas de coleccion (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* y 1 *Trichosporon cutaneum*. De todas las cepas estudiadas, 78 fueron correctamente identificadas por la lectura de la etiqueta, es decir, 97,5% de concordancia con respecto al método FUNGICHOM de Eltech MICROBIO o el API 32C de Biomérieux.
La concordancia global del test de resistencia, en comparación con el FUNGIST de Biorad y la galería ATB Fungus de Biomérieux, es de 87,4%.

Estudio en cepas clinicas

El estudio fue realizado sobre 100 cepas recientemente aisladas provenientes de muestras clínicas recogidas en medicina de ciudad (72 *Candida albicans*, 9 *C. glabrata*, 8 *C. parapsilosis*, 5 *C. tropicalis*, 3 *C. krusei*, 1 *C. inconspicua* y 1 *Saccharomyces* spp).
De todas las cepas estudiadas, 98 fueron correctamente identificadas con respecto al método VITEK de Biomérieux.
La concordancia global del test de resistencia, en comparación con el FUNGIST de Biorad y la galería ATB Fungus de Biomérieux, es de 88,5%. Entre las 10 discordancias, 3 son discordancias mayores y 7 son discordancias menores. Estas discordancias afectan a 4 cepas *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* y 5 *C. tropicalis* y 7 antifúngicos: econazol (2 RI y 1 RS), ketocanazol (1 RI y 2 RS) y micranazol (4 RI).

15- ELIMINACION DE LOS DESECHOS

Los desechos deben ser eliminados respetando las reglas de higiene y la reglamentación en vigor para este tipo de productos en el país de utilización.

16- BIBLIOGRAFIA

1. DUPONT B. 1987. Resistances de *Candida* aux antifongiques. Encyclopédie Médico-Chirurgicale Chap. 4, 23-26.
2. DUPONT-CAMET J., M. E. BOUGROUX, I. VICENS et C. TOURRE-SCHAEFER. 1985. Méthets et limites de l'antifongogramme. Rev. Fr. Lab. 197: 69-72.
3. GRILLOT R., B. LEBEUW et I. SELBMAN. 1989. Isolement et identification des levures, données récentes et perspectives. Rev. Fr. Lab. 197:24-32.
4. PAUGAM A., 1989. Méthet de l'étude *in vitro* de la sensibilité des levures aux antifongiques. Rev. Fr. Lab. 282: 157-159.
5. KONGEN H., J. WALTER et M. KREMER. 1989. Diagnostic et aspects épidémiologiques de 70000 levures isolées en 8 ans. Rev. Fr. Lab. 197: 34-38.

CANDIFAST™ es una marca registrada de Eltech MICROBIO



ELTECH 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

