

CANDIFAST®

Identification des levures et test de résistance aux antifongiques

8 tests (Réf. 44008) 30 tests (Réf. 44030)

CANDIFAST® ES TWIN

Test de résistance des levures aux antifongiques

30 tests (Réf. 44130)

FR-2009-03

1 - INTERET
Le coffret CANDIFAST permet d'identifier, les principales levures médicales et de tester leur résistance à divers antifongiques. Le coffret CANDIFAST ES TWIN permet de tester la résistance des levures à divers antifongiques.

2 - INTRODUCTION
La fréquence des infections fongiques et en particulier celle des levures a augmenté considérablement au cours de ces dix dernières années (5). Les levures sont des agents opportunistes. La plupart sont saprophytes mais peuvent devenir pathogènes lorsqu'existent chez l'homme dans des conditions défavorables. Ces conditions sont principalement les facteurs physiologiques (nouveau-nés, personnes âgées, femmes enceintes), les facteurs locaux (traitements, macérations), les facteurs pathologiques (cancer, insuffisance immunitaire, troubles métaboliques,...), les facteurs iatrogènes (antibiothérapie, pilules contraceptives, immunosuppresseurs, radiations ionisantes, chirurgie). Les tableaux cliniques provoqués par ces levures sont très variés: atteintes cutanées (intertrigo, onyxis ...), atteintes des muqueuses (muguet, esophagites, colites, vaginites ...), atteintes viscérales et septicémiques.

L'augmentation du nombre des produits antifongiques ainsi que la survenue de mycoses résistantes aux traitements justifient l'évaluation du comportement des levures vis-à-vis des antifongiques (1, 2).

3 - PRINCIPES
L'identification de la levure est basée sur :

- la sensibilité au ron de la souche à l'actidione visualisée par le virage au jaune, au jaune-orangé ou au fuchsia de l'indicateur coloré.
- l'étude de la fermentation de sept sucres visualisée par le virage au jaune, au jaune-orangé de l'indicateur coloré où à l'acidification du milieu.
- la mise en évidence d'une activité uréasique qui alcalinise le milieu et fait virer l'indicateur coloré au fuchsia.

La détermination de la résistance des levures aux antifongiques est basée sur la croissance ou non de ces levures en présence de différents antifongiques. Cette croissance est visualisée par un changement de couleur du milieu :

- la fermentation du glucose par les levures entraîne une acidification du milieu qui fait virer le rouge de phénol présent dans le milieu au jaune ou au jaune-orangé.
- l'hydrolyse du urée par les levures uréase positive libère de l'ammoniaque qui alcalinise le milieu et fait virer le rouge de phénol au rose fuchsia.

4 - REACTIFS
Conditionnement :
Réactif

	Quantité	#44008	#44030	#44130
CANDIFAST	8	30	15	35
R1 : Flacon de Réactif 1	10	35	30	30
R2 : Flacon de Réactif 2	1	30	30	1
TC : Flacon de contrôle de turbidité	8	1	1	1

Description :
Galerie 20 puits pré-à l'emploi
CANDIFAST : Chaque galérie permet de tester un schémantillon (identification + test de résistance)
Série pour le test de résistance
Le puits 1 contient de l'actidione (ACT), du glucose et du rouge de phénol.
Les puits 2 à 8 contiennent différents sucres et du rouge de phénol
puits 2 (GLU) glucose
puits 3 (GAL) galactose
puits 4 (FCT) : fructose (65 µg/ml)
puits 5 (ECZ) : éricozazole (16 µg/ml)
puits 6 (KZY) : nystatine (200 unités/mL)
puits 7 (MZZ) : micronazole (16 µg/ml)
puits 8 (FCZ) : fluconazole (16 µg/ml)
Les puits 9 et 10 sont vides.

CANDIFAST ES Twin : Galerie 2x10 puits pré-à l'emploi
Les deux séries de puits correspondent au test de résistance de la galerie CANDIFAST.
Chaque galérie permet de tester deux échantillons (tests de résistance uniquement)
R1 - Flacon de 4 ml de milieu semi-gelée tamponné pour l'identification et la dilution.
Extrait de boeuf 1,3 g/L, Peptone de caséine 1,8 g/L, Extrait de levure 0,8 g/L, Acides aminés, vitamines, minéraux 5,75 g/L, Urée 20 g/L, Agar 0,52 g/L, Antibiotiques 1,12 g/L, pH : 6,05 ± 0,1.
R2 : Flacon de 2 ml de milieu liquide pour le test de résistance.
Extrait de boeuf 1,3 g/L, Peptone de caséine 1,8 g/L, Extrait de levure 0,8 g/L, Acides aminés, vitamines, minéraux 8,75 g/L, Urée 20 g/L, Glucose 6,5 g/L, Rouge de phénol 0,02 g/L, Anticoagulants 11,6 g/L, pH : 7,3 ± 0,1.
Contrôle de turbidité : Flacon de 4 ml de sulfate de baryum pour le contrôle de turbidité.

5 - PRECAUTIONS

- Les réactifs de ce coffret sont destinés à usage *in vitro* uniquement et doivent être manipulés par des personnes habilitées.
- Les prélevements et les réactifs énumérés sont orientementent infectieux. Ils doivent être manipulés avec les précautions d'usage en respectant les règles d'hygiène et la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation pour ce type de produit.
- Les réactifs contenant des matières premières d'origine animale doivent être manipulés avec les précautions d'usage.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.
- Ne pas utiliser les réactifs endommagés ou mal conservés avant utilisation.

- 6 - RECUIL DES ECHANTILLONS**
L'identification et le test de résistance doivent être réalisés à partir de colonies :
 - jeunes (24 à 48 heures)
 - parfaitement isolées à température ambiante ou à 37 °C sur un milieu gélosé, de préférence en boîte de Pétri. Il est recommandé d'effectuer l'isolement sur des milieux spécifiques des levures (3).
- 7 - CONSERVATION DES REACTIFS**
Les réactifs conservés à 2-8 °C sous leur état d'origine sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes. La demi-galerie CANDIFAST ES Twin non utilisée, peut être conservée 7 jours à 2-8 °C dans son emballage d'origine hermétiquement fermé et avec le sachet déshydratant.
- 8 - REACTIF ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS**
 - Huile de paraffine
 - Pipettes stériles
 - Récepteur pour déchets contaminés
- 9 - MODE OPERATOIRE**
Amener les réactifs à température ambiante (18-25 °C) avant emploi.
9.1 - Préparation de l'inoculum
Prélever une colonie isolée à l'aide d'une tige ou d'une pipette Pasteur stérilisée. Puis la décharger dans un flacon de Réactif 1. Homogénéiser. La standardisation de l'inoculum peut être réalisée de différentes façons :
 - **Par rapport au flacon TC de contrôle de turbidité**
Ajuster l'opacité du Réactif 1 ensemencé à celle du flacon TC en s'adaptant des traits noirs des étiquettes de flacon.
 - Si le Réactif 1 est plus clair (inoculum insuffisant), reensemencer le flacon jusqu'à l'obtention d'une opacité égale à celle du flacon TC.
 - Si le Réactif 1 est plus trouble (inoculum trop riche), diluer à l'aide d'un nouveau flacon de Réactif 1 jusqu'à obtention d'une opacité correcte.

- 9.2. Inoculation de la galerie CANDIFAST**
Identifier la galérie. Soulever l'étiquette adhésive, puis distribuer dans chacun des 5 premiers puits :
 - 100 µL de R1 ensemencé et standardisé
 - 2 gouttes d'huile de paraffine.

Recouvrir la série de puits avec l'étiquette adhésive.
 Dans un premier temps inoculer le Réactif 2 par 100 µL de Réactif 1 ensemencé et standardisé (cf. § 9.1). Puis dans un deuxième temps soulever l'étiquette adhésive et distribuer dans chacun des 6 premiers puits :
 - 100 µL de R2 préalablement ensemencé
 - 2 gouttes d'huile de paraffine.
 Recouvrir la série de puits avec l'étiquette adhésive.
 Pour la série de puits avec l'étiquette adhésive.
 2 puits vides Z1 Z2 Z3 L3 J1 AN BV O
- 9.3. Incubation de la galerie CANDIFAST**
Incuber la galérie. Soulever l'étiquette adhésive, puis distribuer dans chacun des 5 premiers puits :
 - 100 µL de R1 ensemencé et standardisé
 - 2 gouttes d'huile de paraffine.

Recouvrir la série de puits avec l'étiquette adhésive.
 Dans un premier temps inoculer le Réactif 2 par 100 µL de Réactif 1 ensemencé et standardisé (cf. § 9.1). Puis dans un deuxième temps soulever l'étiquette adhésive et distribuer dans chacun des 6 premiers puits :
 - 100 µL de R2 préalablement ensemencé
 - 2 gouttes d'huile de paraffine.
 Recouvrir la série de puits avec l'étiquette adhésive.
 2 puits vides Z1 Z2 Z3 L3 J1 AN BV O

- 9.4. Inoculation de la galerie CANDIFAST ES Twin**
Série pour un premier échantillon
Inoculer le Réactif R2 avec 100 µL de réactif R1 ensemencé et standardisé.
 Bien identifier chacun des côtés de la galérie.
 Soulever l'étiquette adhésive puis distribuer dans chacun des 6 premiers puits de la première série :
 - 100 µL de Réactif 1 préalablement ensemencé
 - 2 gouttes d'huile de paraffine.

Recouvrir la série de puits avec l'étiquette adhésive.
Série pour un deuxième échantillon
 Ensemencer de la même façon la deuxième série à l'aide d'un autre flacon de Réactif 2 préalablement ensemencé en procédant comme indiqué ci-dessus.
 Recouvrir la série de puits avec l'étiquette adhésive.
 2 puits vides Z1 Z2 Z3 L3 J1 AN BV O

- 9.5. Incubation**
Incuber la galérie à 37 °C pendant 24 heures, si besoin et selon les souches poursuivies l'incubation jusqu'à 48 heures voir 72 heures.
- Lire la galérie lorsque les levures ont poussé dans le puits contrôle.
- 10 - LECTURE ET INTERPRETATION DE LA GALERIE**
Ne lire l'ensemble de la galérie que si dans le puits contrôle (C*) : Puits 1 de la série pour le test de résistance) on observe un changement de couleur du milieu :
 - virage au jaune, ou au jaune-orangé ou au fuchsia
 - virage au blanc

10.1 Série pour l'identification
Puits 1 (ACT)
 Le caractère est positif lorsque dans le puits ACT on observe un changement de couleur du milieu :
 - Virage au jaune, ou au jaune-orangé ou au fuchsia
 - Capotage négatif ou traduit par une absence de virage au jaune, ou au jaune-orangé ou au fuchsia.

Puits 2 à 8 (GLUCIDES)
 Un caractère est positif lorsque dans un de ces puits on observe un changement de couleur du milieu :
 - Virage au jaune, ou au jaune-orangé, ou au fuchsia
 - Capotage négatif ou traduit par une absence de virage au jaune, ou au jaune-orangé ou au fuchsia.

Un caractère est positif lorsque dans un de ces puits on observe un changement de couleur du milieu :
 - Virage au blanc
 - Capotage négatif ou traduit par une absence de virage au blanc

Un caractère négatif se traduit par une absence de virage au jaune ou au jaune-orangé ou au fuchsia.
 Pour l'interprétation se reporter au tableau ci-dessous ou à la suite indiquée dans le coffret. Les données indiquées sont à valoir à titre d'orientation. Elles ne constituent pas une recommandation. Le nom du genre est indiqué sur l'actidione (C*) en fonction du caractère positif (rangée inférieure) ou négatif (rangée supérieure) de l'actidione et du sucre testé.

	ACT	GLU	GAL	THE	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>	-	+	+	+	+	+	+	+
Genres <i>Cryptococcus</i> ou <i>Trichosporon</i> ou <i>Rhodothula</i>	-	-	-	-	-	-	+	+

uréease positive

- Diagnostic différentiel**
Les genres *Cryptococcus*, *Trichosporon* et *Rhodothula* peuvent être différenciés par des caractères morphologiques.
 - *Rhodothula* comme des colonies de couleur saumon bien caractéristiques sur gélose Sabouraud.
 - *Cryptococcus* possède une capsule polysaccharidique mise en évidence par la coloration à l'encre de chine diluée au 1/5. Il donne sur gélose Sabouraud des colonies de couleur saumon moins intenses que les colonies de *Rhodothula*.
- Remarques**
 - Dans le genre *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae* est la principale espèce pathogène rencontrée chez l'homme. Des souches de *Saccharomyces boulardii* ou de *Saccharomyces cerevisiae* peuvent être isolées de patient sous traitement à base de levures.
 - Un examen microscopique permet de différencier les deux espèces :
 - *S. cerevisiae* sont des levures obovales, de grande taille.
 - *S. boulardii* sont des levures ovales à allongées de plus petite taille.
- Avec la galérie CANDIFAST certaines souches *Cryptococcus* peuvent pousser en présence d'actidione.

- 10. Série pour le test de résistance**
Puits 2 à 8 (L3 à FZ3)
 Un changement de couleur du milieu, au jaune ou au jaune orangé ou au fuchsia traduit la capacité de la souche testée à se développer à la concentration testée de l'antifongique. Dans ce cas, la souche est rendue résistante.
 Par contre, la couleur rouge orangé du milieu indique que la souche a été inhibée par l'antifongique contenu dans la coupule.
- 11 - CONTRÔLE DE QUALITE**
Afin de vérifier la standardisation de la méthode, il est recommandé de réaliser un contrôle de qualité de façon périodique en utilisant les souches de référence. *C. albicans* ATCC 90029 et *C. parapsilosis* ATCC 22019.
- Souche**

	ACT	GLU	GAL	THE	MAL	CEL	RAF	LAC	C*	AB	N	FCT	ECZ	KTZ	MCZ	FCZ
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(ATCC 22019)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- 12 - CAUSES D'ERREURS**
 - Préparation d'un inoculum trop riche ou trop faible.
 - Préparation de l'inoculum à partir d'un mélange de culture ou avec des colonies isolées de plus de 48 heures.
 - Lecture de la galérie en absence de virage de couleur dans le puits de contrôle de croissance.
 - Lecture de la galérie 24 à 48 heures après virage de couleur dans la présente notice.
 - Et d'une façon générale, le non-respect des recommandations de la présente notice.
- 13 - LIMITES DE LA METHODE**
 - Cette méthode de détermination *in vitro* de la résistance aux antifongiques à une valeur indicative sur l'interaction du couple antifongique-levure lors des traitements *in vivo* (2,4).
 - La méthode CANDIFAST a été développée pour identifier et déceler la résistance des souches d'origine cutané-muqueuses. Il est donc recommandé pour des souches isolées de mycoses systémiques.
 - La méthode CANDIFAST ne permet pas une catégorisation en Sensible-Intermédiaire-Résistant.
 - Des souches thermosensibles isolées à 20 °C possèdent différemment à 37 °C, dans ce cas, soit les levures ne pousseront pas, soit pousseront mal et l'identification ainsi que la mise en évidence de la résistance à certains antifongiques ne pourront être réalisées.
 - Pour certaines souches de *C. lusitanae* un retard de croissance dans le puits THE ne permet pas l'identification par la lecture du tableau. Leur compte de la lecture de l'échantillon.
 - Pour certaines souches de *C. glabrata* la difficulté de lecture du caractère GAL ne permet pas l'identification par la lecture du tableau. Leur compte de la lecture de l'échantillon.
 - L'interprétation de la lecture des tests de résistance ne doit pas tenir compte du trouble, un voile pouvant apparaître après incubation pour les antifongiques azolés.

- 14 - PERFORMANCES**
Etude sur souches de collection
L'étude a été réalisée sur 80 souches de collection (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* et 1 *Trichosporon cutaneum*. 78 souches ont été correctement identifiées par la lecture à l'aide de l'échantillon, soit 97,5% de concordance par rapport à la méthode FUNGICHROM d'ELITech MICROBIO ou API 32C de Biomérieux.
 La concordance globale du test de résistance, par comparaison au FUNGITEST de Biorad et à la galérie ATB Fungus de Biomérieux, est de 87,4%.
- Etude sur souches cliniques**
L'étude a été réalisée sur 100 souches fraîchement isolées provenant de prélèvements cliniques en médecine de ville (72 *Candida albicans*, 9 *C. glabrata*, 8 *C. parapsilosis*, 5 *C. tropicalis*, 3 *C. krusei*, 1 *C. kefyr*, 1 *C. inconspicua* et 1 *Saccharomyces spp.*)
 98 souches ont été correctement identifiées par rapport au système VITEK de Biomérieux.
 La concordance globale du test de résistance, par comparaison au FUNGITEST de Biorad et à la galérie ATB Fungus de Biomérieux, est de 98,5%. Parmi les 10 discordances, 3 sont des discordances majeures et 7 sont des discordances mineures. Ces discordances concernent 4 souches (2 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* et 1 *C. tropicalis*) et 1 *C. inconspicua* dont la concordance est de 100% (2 R1 et 1 R5), le kétoconazole (1 R1 et 2 R5) et le micronazole (4 R1).
- 15 - ELIMINATION DES DECHIETS**
Les déchets doivent être éliminés en respectant les règles d'hygiène et la réglementation en vigueur pour ce type de réactifs dans le pays d'utilisation.
- 16 - BIBLIOGRAPHIE**
 1. DUPONT B., 1967. Résistance de *Candida* aux antifongiques. Encyclopédie Médico-Chirurgicale. C1ap. 4, 23-28.
 2. DUPOUY-CAMET J., M.-E. BOUGNOUX, J. VICENS et C. TOURTE-SCHAEFER. 1989. Intérêts et limites de l'antifongogramme. Rev. Fr. Lab. 197- 89-72.
 3. GRILLIOT R., LEBEAU et J. SELBMAN. 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 isolées en 8 ans. Rev. Fr. Lab. 197- 34-38.

CANDIFAST® est une marque déposée de ELITechMICROBIO

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

CANDIFAST®

Identification of yeasts and antifungal resistance test
8 tests (Cat. N° 44008) 30 tests (Cat. N° 44030)

CANDIFAST® ES TWIN

Antifungal resistance test for yeasts
30 tests (Cat. N° 44130)

EN4-2009-03

1 - INTENDED USE

The CANDIFAST kit allows the identification of the main human pathogenic yeasts as well as the testing of their resistance to various antifungal agents.
 The CANDIFAST ES TWIN kit is intended for testing the resistance of yeasts to various antifungal agents.

2 - INTRODUCTION

Fungal infections and especially those caused by yeasts have significantly increased over the last ten years (5). Yeasts are opportunistic agents. Most of them are saprophytes, but they can become pathogenic when the conditions in the host become favourable. These conditions are mainly the physiological factors (newborn babies, elderly people, pregnant women), the local factors (challenges, macrations), the pathological factors (cancer, immune deficiency, metabolic disorders...), the therapy-related factors (antibiotics, birth control pills, immuno-suppressive agents, ionising radiation, surgery...). The clinical features caused by these yeasts are quite varied: cutaneous suppressive agents, onychias, ...). The clinical features caused by asphagitis, colitis, vaginitis ...). visceral and septicaemic conditions.
 The increase in the number of available antifungal agents and the appearance of treatment-resistant mycoses justify testing the response of the yeasts in the presence of antifungal agents (1, 2).

3 - PRINCIPLE

The identification of the yeasts is based on:
 • the susceptibility of the strain being tested to acedione which is visualized by a colour change of the indicator either to yellow, to orange-yellow or to fuchsia;
 • the fermentation of seven sugars which is visualized by a colour change of the indicator to yellow or to orange-yellow due to the acidification of the medium;
 • the demonstration of urease activity, which produces an alkalization of the medium, resulting in the indicator changing to a fuchsia colour.

The determination of the resistance of yeasts to antifungal agents is based on the growth or the absence of growth of these yeasts in the presence of various antifungal agents. Growth is demonstrated by a colour change of the medium:
 • the fermentation of glucose by the yeasts leads to acidification of the phenol red containing medium, making it change to a yellow or to an orange-yellow colour;
 • the hydrolysis of urea by the urease-positive yeasts releases ammonia which alkalizes the phenol red containing medium, making it change to a fuchsia-pink colour.

4 - REAGENTS

Packaging

Reagent	Quantity	#44008	#44030	#44130
CANDIFAST	8	30		
CANDIFAST ES Twin	8		30	
R1 : Vial of Reagent 1	10	35		15
R2 : Vial of Reagent 2	8	30		35
TC : Vial of Turbidity Control	1			30

Description

CANDIFAST : 20-well tray, ready for use
 Each tray allows the testing of one sample (identification + resistance test)

Row for Identification

Well 1 contains phenol red, actidione (ACT) and glucose
 Wells 2 to 8 contain phenol red and a different sugar as follows:
 well 2 (GLU) : glucose
 well 3 (GAL) : galactose
 well 4 (FRU) : fructose
 well 5 (MAL) : maltose
 well 6 (CEL) : cellobiose
 well 7 (RAF) : raffinose
 well 8 (LAC) : lactose
 wells 9 and 10 are empty

CANDIFAST ES Twin :

2x10-well tray, ready for use
 The two rows of wells are identical to the resistance test row of the CANDIFAST tray.
 Each tray allows the testing of two samples (resistance tests only).

R1 : 4-mil vial of buffered agar medium for dilution and identification, Beef extract 1.3g/L, Casein peptone 1.5g/L, Yeast extract 0.8g/L, Amino acids, vitamins, minerals 5.75g/L, Urea 20g/L, Agar 0.52g/L, Antibiotics 1.12g/L, pH : 6.05 ± 0.1.
R2 : 2-mil vial of YNB (yeast nitrogen base) medium containing urea and phenol red for resistance test, Beef extract 1.3g/L, Casein peptone 1.8g/L, Yeast extract 0.8g/L, Amino acids, vitamins, minerals 8.75g/L, Urea 20g/L, Glucose 8.5g/L, Phenol red 0.028g/L, Antibiotics 1.16g/L, pH : 7.3 ± 0.1.

TC :

4-mil vial of barium sulphate solution.

5 - PRECAUTIONS

- The reagents are intended solely for *in vitro* use and must be handled by authorised personnel.
- The samples and inoculated reagents are potentially infectious; they must be handled with caution, in observance of hygiene rules and the current regulations for this type of product in the country of use.
- Reagents containing raw material of animal origin must be handled with caution.
- Do not use reagents after the expiry date.
- Do not use reagents that have been damaged or that have been poorly conserved before use.

6 - SPECIMEN COLLECTION

The colonies used for performing the identification and the resistance test should be young (24 to 48 hours old) and perfectly isolated at room temperature or at 37 °C on an agar medium, preferably in a Petri dish. It is recommended that isolation be made on media that are specific for yeast (3).

7 - REAGENT STOCKAGE

The kit and its contents, when stored at 2-8°C in their original state are stable until the expiry date indicated on the box. One half of a CANDIFAST ES Twin may be stored at 2 to 8°C for 7 days, in its original packaging, resealed with the desiccant.

8 - REAGENT AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Paraffin oil
- Sterile pipettes
- Container for contaminated waste

9 - PROCEDURE

Allow the reagents to reach room temperature (18-25 °C) before use

Pick up an isolated colony with a wire loop or an occluded Pasteur pipette. Inoculate a vial of Reagent 1 with the colony. Mix well. The standardization of the inoculum can be performed in three different ways:

With Respect to the Turbidity Control Vial

Adjust the opacity of the inoculated Reagent 1 to that of the Turbidity Control with the aid of the black lines printed on the vial labels.

If Reagent 1 is lighter (insufficient inoculum), inoculate the vial further until the opacity obtained equals that of the Turbidity Control vial.
 If Reagent 1 is more turbid (inoculum too rich), dilute it with Reagent 1 from another freshly opened vial until the correct turbidity is obtained.

With a Densitymeter

Verify with a densitymeter that the turbidity of inoculated Reagent 1 is equal to 1 Mac Farland. If necessary, proceed as above to adjust the turbidity.

Enumeration in Maltassez Cell

It is possible to standardize the inoculum by counting the yeasts in a Maltassez cell. A solution of 2,500 to 3,500 yeasts per mm³ must be obtained.

9.2a. Inoculation of CANDIFAST tray

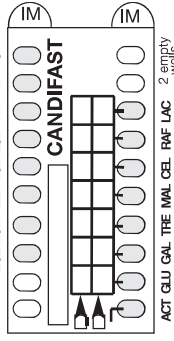
Mark the test-tray to identify the specimen being tested. Lift the adhesive tape and dispense into each of the first 8 wells as follows:
 - 100 µL of inoculated standardized R1
 - 2 drops of paraffin oil

Resistance test vial

Reseal the test-tray with the adhesive tape.

First, inoculate Reagent 2 with 100 µL of inoculated standardized Reagent 1 (see 9.1). Then, lift the adhesive tape and dispense into each of the first 8 wells as follows:

- 100 µL of inoculated R2
 - 2 drops of paraffin oil
 Reseal the test-tray with the adhesive tape.



2 empty wells

Inoculate the test-tray at 37°C for 24 hours; if necessary and depending on the strains, this incubation may be prolonged for up to 48 or even, 72 hours. The tray is read once the yeast have grown in the control well.

10 - READING AND INTERPRETATION

Head each test-tray in its entirety only if in the control well (C-; Well 1 of the resistance test row) there is the following colour change of the medium :
 - Colour change to yellow, to orange-yellow, or to fuchsia* (*for urease positive genera)

10.1 Identification Row

Well 1 (ACT)

The characteristic is positive when a colour change of the medium is observed;

A characteristic is negative when there is no colour change to yellow, to orange-yellow or to fuchsia.

A characteristic is positive when a colour change of the medium is observed;

A characteristic is negative when there is no colour change to yellow, to orange-yellow, or to fuchsia.

The identification of the yeasts is performed with the CANDIFAST tray in parallel with the analysis of the morphological features of the colonies.

For interpretation, refer to the table below or to the chart provided in the kit. The markings on the test-tray adhesive tape may also be used : read the actidione well first; then, locate the last positive well, on the right of it. The name of the germ is printed on the adhesive tape at the intersection of the actidione-positive (lower row) or actidione-negative (upper row) characteristic and the located sugar.

Yeast

Candida albicans

Candida albicans (var stellatoidea)

Candida glabrata

Candida kefyr

Candida krusei

Candida lusitanae

Candida parapsilosis

Candida tropicalis

Saccharomyces

Cryptococcus or *Trichosporon*

or *Rhodothraulis* genera

ACT GLU GAL TRE MAL CEL RAF LAC

+ + + + + v + - - - -

+ + + + + v + - - - -

+ + + + + v + - - - -

+ + + + + v + - - - -

+ + + + + v + - - - -

+ + + + + v + - - - -

+ + + + + v + - - - -

+ + + + + v + - - - -

+ + + + + v + - - - -

Differential Diagnosis

- Cryptococcus*, *Trichosporon* and *Rhodothraulis* species may be differentiated by morphological examination.
- Rhodothraulis* species are characterised by distinctive orange-red colonies when grown on Sabouraud's dextrose agar.
- Some strains of *Cryptococcus* species may also produce a redish pigmentation. Therefore, *Cryptococcus* species should be examined for the presence of a capsule by an India ink preparation.
- Trichosporon* species produce pseudohyphae when grown on PCB agar medium.

Note

- Among *Saccharomyces* species, *Saccharomyces cerevisiae* is the main human pathogenic species.
- Strains of *Saccharomyces boulardii* or *Saccharomyces cerevisiae* can be isolated from patients undergoing a treatment based on yeasts.
- A microscopic examination can differentiate the two species:
 - *S. cerevisiae* are large globular yeasts.
 - *S. boulardii* are smaller in size, egg-shaped or elongated.
- With the CANDIFAST test some strains of *Cryptococcus* may grow in presence of actidione.

10.2 Resistance test row

Wells 2 to 8 (AB to FZ)
 A colour change of the medium to yellow, to orange-yellow, or to fuchsia indicates that the strain being tested is able to grow in that well and is therefore resistant to the antifungal present.
 If the well remains orange-red, the growth of the tested strain has been inhibited by the antifungal in that well.

11 - QUALITY CONTROL

It is recommended that the standardization of the method be checked from time to time using the reference strains, *Candida albicans* ATCC 90029 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Strain

Strain	ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC	C-	AB	NY	FCT	ECZ	KTZ	MCZ	FZC
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCC 90029	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCC 22019	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

12 - CAUSES OF ERROR

- Preparation of an inoculum that is either too concentrated or not concentrated enough.
- Preparation of the inoculum from a mixed culture or with isolated colonies grown for more than 48 hours.
- Tray read before the apparition of a colour change of the growth indicator.
- Tray not read after incubation for 24 or 48 hours, even though the growth indicator was positive.
- In general, the non-respect of the recommendations contained within the instructions.

13 - LIMITATIONS

- This *in vitro* method for the determination of the resistance to antifungal agents has an indicative value for the antifungal-yeast interaction during *in vivo* treatment (2,4).
- The CANDIFAST procedure is intended for the identification and the testing of resistance to antifungal agents of yeasts of multicellular origin only. It is therefore not to be used for yeast strains from systemic mycoses.
- The CANDIFAST procedure does not allow a categorization into *Saccharomyces*-*Hemiasporium*-*Basidiomycota*.
- Some *Hemiasporium* strains isolated at 20 °C grow differently at 37 °C. In this case, either the yeasts will not grow or they will grow poorly. As a consequence it would be very difficult, if not impossible, to carry out a reliable strain identification or to assess their resistance to certain antifungal agents.
- For certain strains of *C. lusitanae* a delay of growth in the TRE well makes identification with the enclosed table difficult to achieve.

14 - PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Collection strains

The study was carried out using 80 collection strains (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 strains were correctly identified with the aid of the markings on the test-tray adhesive tape and gave a concordance of 97.5% with the ELITEch MICROBIO FUNGIO-HROM method and the Bloméieux API 32C method. The overall concordance for the resistance test compared with the Bloméieux ATB Fungus tray, was 87.4%.

Clinical strains

The study was carried out on 100 freshly isolated strains from clinical samples taken from patients in community health practices (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 strains were correctly identified in comparison with the Bloméieux VITEK method. The overall concordance for the resistance test compared with the Bloméieux ATB Fungus tray, was 98.5%. Among the 10 discrepancies, 9 are major errors and 7 are minor errors. These discrepancies concern 4 strains (2 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* and 1 *C. tropicalis*) and 3 antifungal agents : econazole (2 RI and 1 R/S), ketoconazole (1 RI and 2 R/S) and miconazole (4 RI).

Waste ELIMINATION

Waste should be disposed of in accordance with the hygiene rules and current regulations for this kind of product in the country of use.

BIBLIOGRAPHY

- DUPONT B., 1987. Résistance de *Candida* aux antifongiques. Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Chap. 4, 23-26.
- DUPOUY-CAMET J., M.-E. BOUGNOUX, I. VICENS et J. TOURTE-SCHAEFER, 1989. Infrarés et limites de l'antigramme. Rev. Fr. Lab. 197, 69-72.
- GRILLIOT R., B. LEBEAU et J. SELBMAN, 1989. Isolément et identification des levures, données récentes et perspectives. Rev. Fr. Lab. 197, 24-32.
- PAUGAM A., 1986. Infrarés de l'étude *in vitro* de la sensibilité des levures aux antifongiques. Rev. Fr. Lab. 282, 157-159.
- KOENIG H., J. WALLER et M. KREMER, 1983. Diagnostic et aspects épidémiologiques de 70 000 levures isolées en 6 ans. Rev. Fr. Lab. 197, 34-38.

CANDIFAST® is a trademark of ELITEch MICROBIO

ELITEch MICROBIO
 Parc d'activités du Plateau
 19, allée d'Athènes
 83870 SIGNES
 FRANCE

Tél. : 33 (0)4 94 88 55 00
 Fax : 33 (0)4 94 88 55 22



