

CANDIFAST®

Identificarea levurilor și test de determinare a sensibilității la antifungice

8 teste (Cod 44008) 30 de teste (Cod 44030)

CANDIFAST® ES TWIN

Test pentru determinarea rezistenței levurilor la antifungice

30 de teste (Cod 44130)

RO-2009-03_CPB 0038



1 - RECOMANDĂRI GENERALE
 CANDIFAST® a fost conceput pentru identificarea principalelor levuri de interes medical și testarea rezistenței acestora la diferite substanțe antifungice. Pachetul CANDIFAST® ES TWIN a fost conceput pentru testarea sensibilității levurilor la diferite antifungice.

2 - INTRODUCERE
 Prevența infecțiilor cauzate de levuri a crescut semnificativ în ultimii zece ani (5). Levurile sunt agenți oportuniști. Majoritatea dintre ele sunt saprofite, dar pot deveni patogene când organismul gazdă oferă condiții favorabile. Aceste condiții sunt în principal factori fiziologici (nou născuți, persoane în vârstă, sarcină), factori locali (ulcerații, macerații), factori patologici (cancer, imunodeficiență), disfuncții metabolice), factori ce țin de terapii (antibiotice, anticoncepționale, medicamente imunosupresive, radiații ionizante, intervenții chirurgicale). Modificările clinice cauzate de levuri sunt variate: efecte cutanate (interigo, onyxis), disfuncții mucoconatate (candidoză orală, esofagită, colită, vaginită), afecțiuni viscerale și septicemii.
 Creșterea numărului de antifungice accesibile și apariția micozelor rezistente la tratament justifică testarea comportamentului levurilor în prezența antifungicelor (1, 2).

3 - PRINCIPIU
 Identificarea levurilor se bazează pe următoarele observații:
 • sensibilitatea tulpinii la acidonă, care se indică prin schimbarea culorii indicatorului în galben, galben-portocaliu sau roșu;
 • studiul de fermentare a șapte tipuri de glucide, detectată prin schimbarea culorii indicatorului în galben sau galben-portocaliu datorită acidificării mediului
 • demonstrarea activității ureazice, care cauzează alcalinizarea mediului, schimbând culoarea indicatorului în roșu.
Determinarea sensibilității levurilor la antifungice se bazează pe creșterea sau inhibiția creșterii acestora în prezența diferitelor substanțe antifungice. Creșterea este demonstrată prin schimbarea culorii mediului:
 • fermentarea glucozei datorită levurilor acidifică mediul, ceea ce determină virajul de roșu fenol din mediu în galben sau galben-portocaliu.
 • hidroliza ureei prin eliberarea amoniacului de către levurile ureazo-pozitive alcalinizează mediul, ceea ce determină virajul de roșu fenol din mediu în roz.

4 - REACTIVI

| Condiționare: Reactiv | #44008 | Cantitate #44030 | #44130 |
|---------------------------------------|--------|---------------------|--------|
| CANDIFAST | 8 | 30 | - |
| CANDIFAST ES Twin | - | - | 15 |
| R1 : Flacon de reactiv 1 | 10 | 35 | 35 |
| R2 : Flacon de reactiv 2 | 8 | 30 | 30 |
| TC : Flacon de control de turbiditate | 1 | 1 | 1 |

Descriere:
CANDIFAST: Galerie cu 20 de godeuri deja pregătite
 Fiecare galerie permite testarea unei eșantion (identificare + test de rezistență)
Rândul de identificare:
 Godeul 1 conține roșu fenol, acidonă (ACT) și glucoză.
 Godeurile 2-8 conțin roșu fenol și câte un zahăr:
 godeul 2 (GLU): glucoză
 godeul 3 (GAL): galactoză
 godeul 4 (TRE): trehaloză
 godeul 5 (MAL): maltoză
 godeul 6 (CEL): celobioză
 godeul 7 (RAF): rafinoză
 godeul 8 (LAC): lactoză
 Godeurile 9 și 10 sunt goale.
CANDIFAST® ES Twin : Galerie 2x10 godeurile deja pregătite
 Cele două rânduri de godeuri corespund testului de rezistență din galeria CANDIFAST.
 Fiecare galerie permite testarea a două eșantioane (numai teste de rezistență)

R 1 - Flacon de 4 mL de mediu semi-geloză tamponată pentru identificare și diluare.
 Extract de bou 1,3 g/L, Peptonă de caseină 1,8 g/L, Extract de levră 0,8 g/L, Aminoacizi, vitamine, minerale 5,75 g/L, Uree 20 g/L, Agar 0,52 g/L, Antibiotice 1,12 g/L. pH: 6,05 ± 0,1.
R 2 : Flacon de 2 mL mediu lichid pentru testul de rezistență.
 Extract de bou 1,3 g/L, Peptonă de caseină 1,8 g/L, Extract de levră 0,8 g/L, Aminoacizi, vitamine, minerale 5,75 g/L, Uree 20g/L, Glucoză 8,5g/L, Roșu de fenol 0,052 g/L, Antibiotice 1,16 g/L. pH: 7,3 ± 0,1.

TC: Flacon de 4 mL de sulfat de bariu pentru controlul diluției.

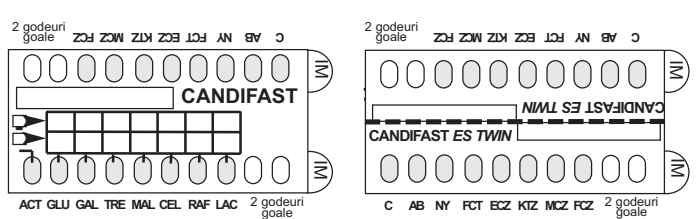
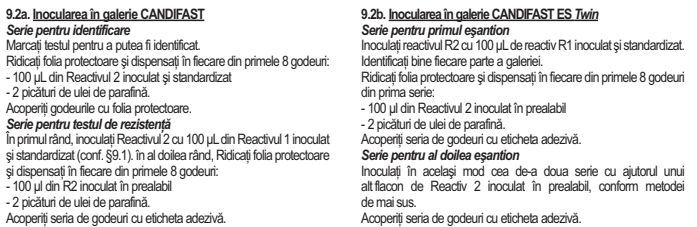
5 - PRECAUȚII
 • Reactivii sunt numai pentru diagnostic in vitro și trebuie utilizați de personal autorizat.
 • Probele colectate și reactivii însăși reprezintă o potențială sursă de infecție și vor fi manipulați cu precauție, respectând regulile de igienă și reglementările naționale în vigoare pentru acest tip de produs.
 • Reactivii conțin materii prime de origine animală și trebuie manipulați cu atenție.
 • Nu utilizați reactivii după termenul de expirare.
 • Nu utilizați reactivii care sunt deteriorați sau care au fost depozitați în mod necorespunzător înainte de utilizare.

6 - RECOLTAREA PROBELOR
 Coloniile prelevate pentru identificarea și testarea sensibilității trebuie să fie:
 - tinere (24-48 ore)
 - să fie izolate la temperatura camerei sau la 37 °C pe mediu solid, de preferabil în cutii Petri. Se recomandă ca mediul să fie specific pentru levuri. (3).
7 - PĂSTRAREA REACTIVILOR
 Reactivii păstrați la 2-8°C sunt stabili în starea originală până la data menționată pe cutie.
 Semi-galeria CANDIFAST ES Twin neutilizată poate fi păstrată 7 zile la 2-8°C în ambalajul original închis ermetic împreună cu agentul de deshidratare.

8 - REACTIVI ȘI MATERIALE NECESARE DAR NEINCLUSE ÎN KIT
 • Ulei de parafină
 • Incubator la 37°C
 • Pipete sterile
 • Container pentru deșeuri contaminate

9 - METODA DE LUCRU
Aduceți reactivii la temperatura camerei (18-25°C) înainte de utilizare.
9.1. Prepararea inoculului
 Prelevați o colonie izolată cu o ansă sau cu o pipetă Pasteur. În continuare, însămânțați colonia într-un flacon cu Reactiv 1. Se amestecă cât mai bine. Standardizarea inocului se poate efectua pe trei căi:
 • În raport cu flaconul TC de control de turbiditate
 Ajustați opacitatea Reactivului 1 deja însămânțat în funcție de flaconul TC consultând liniile negre tipărite pe eticheta flaconului TC.
 Dacă Reactivul 1 este mai deschis la culoare decât (inocul insuficient), reînsmânțați flaconul până se obține o opacitate egală cu cea a flaconului TC.
 Dacă Reactivul 1 este prea tulbur (inocul prea bogat), diluați cu un nou flacon de Reactiv 1 până ce obțineți opacitatea corectă.
 • Cu ajutorul Densitometrului
 Verificat cu un densitometru dacă turbiditatea Reactivului 1 inoculat este egală cu 1 MacFarland. Dacă este necesar, ajustați turbiditatea conform procedurii descrise.
 • Enumerare într-o Celulă Malassez
 Standardizarea inocului este posibilă prin numărarea levurilor într-o celulă Malassez. Trebuie obținută o soluție de 2 500 - 3 500 levuri/mm³.

9.2a. Inocularea în galerie CANDIFAST
Serie pentru identificare
 Marcați testul pentru a putea fi identificat.
 Ridicați foia protectoare și dispensați în fiecare din primele 8 godeuri:
 - 100 µL din Reactivul 2 inoculat și standardizat
 - 2 picături de ulei de parafină.
 Acoperiți godeurile cu foia protectoare.
Serie pentru testul de rezistență
 În primul rând, inoculați Reactivul 2 cu 100 µL din Reactivul 1 inoculat și standardizat (conf. §9.1). În al doilea rând, Ridicați foia protectoare și dispensați în fiecare din primele 8 godeuri:
 - 100 µL din R2 inoculat în prealabil
 - 2 picături de ulei de parafină.
 Acoperiți seria de godeuri cu eticheta adezivă.



9.3. Incubare
 Inocuați galeria la 37°C timp de 24 de ore, dacă este cazul și, în funcție de tulpini prelungiți perioada de incubare până la 48 sau chiar 72 de ore.
 Citiți galeria după ce levurile au pătruns în godeurile de control.

10 - CITIREA ȘI INTERPRETAREA GALERIEI
 Nu citiți întreaga galerie decât dacă în godeul de control (C+; Godeuri 1 din seria de test de rezistență) se observă o schimbare a culorii mediului:
 - **viraj la galben sau galben-portocaliu sau roșu* (* pentru genurile de urează pozitivă)**
10.1 Serie pentru identificare
Godeuri 1 (ACT)
 Caracterul este pozitiv dacă într-unul din aceste godeuri se observă o schimbare de culoare a mediului:
 - **Viraj la galben sau galben-portocaliu sau purpuru**
 Caracterul negativ se traduce prin lipsa virajului de culoare la galben sau galben-portocaliu sau purpuru.
Godeuri 2+8 (GLU & RAF)
 Caracterul este pozitiv dacă într-unul din aceste godeuri se observă o schimbare de culoare a mediului:
 - **Viraj la galben sau galben-portocaliu sau purpuru**
 Caracterul negativ se traduce prin lipsa virajului de culoare la galben sau galben-portocaliu sau purpuru.
 Levura se identifică cu ajutorul galeriei și a caracterelor morfologice ale coloniilor.
 În vederea interpretării trebuie să ne raportăm la tabelul de mai jos sau la fișa inclusă în pachet, ne mai putem folosi în egală măsură de indicațiile menționate de foia adezivă a galeriei: **citiți godeurile acidione (ACT), după care reperați ultimul godeu pozitiv din partea dreaptă.** Numele germenului este menționat pe foia adezivă la intersecția caracterului pozitiv (rândul inferior) sau negativ (rândul superior) al acidionei și aminoacizilor depistați.

| Levră | 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 | - |

Genurile *Cryptococcus* sau *Trichosporon* sau *Rhodotorula* v urează pozitivă

• Diagnostic diferențial
 Genurile *Cryptococcus*, *Trichosporon* sau *Rhodotorula* pot fi diferențiate prin caractere morfologice.
 - *Rhodotorula* produce colonii de culoare roșie somon cu caracteristici puternice pe geloză Sabouraud.
 - *Cryptococcus* are o capsulă polizaharică evidențiată de colorație de cearneală de China diluată la 1/5. Il pe geloză Sabouraud dă colonii de culoare roșie somon de intensitate mai mică decât coloniile de *Rhodotorula*.
 - *Trichosporon* prezintă un pseudomicelium pe mediu PCB.
 • **Observații**
 • În cadrul speciei *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae* este principala specie patogenă întâlnită în tânăla.
 • Tulpinile de *Saccharomyces boulardii* sau *Saccharomyces cerevisiae* pot fi izolate de pacient prin tratament pe bază de levuri.
 • Analiza la microscop permite o diferențiere între cele două specii:
 - *S. cerevisiae* sunt levuri globuloase de talie mare.
 - *S. boulardii* sunt levuri ovoidे cu prelungiri de talie mai mică.
 • În cazul galeriei CANDIFAST, anumite tulpini *Cryptococcus* pot crește în prezența acidionei.

10.2 Seria pentru testul de rezistență
Godeurile 2-8 (AB - FCZ)
 O schimbare de culoare a mediului în galben sau galben portocaliu sau roșu denotă capacitatea tulpinii testate de a se dezvolta în medii cu concentrația antifungică testată. În acest caz, tulpina a dobândit rezistență.
 În caz contrar, dacă mediul devine roșu portocaliu, tulpina a fost înhabitată de concentrația de antifungic din recipient.

11 - CONTROL DE CALITATE
 Pentru a verifica standardizarea metodei, se recomandă realizarea unui control periodic al calității folosind tulaie de referință, C. albicans ATCC 90029 și C. parapsilosis ATCC 22019.

| Tulpina | Incubație | Rezultate scontate | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|---|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| | | ACT | GLU | GAL | TRE | MAL | CEL | RAF | LAC | C+ | AB | N | FCT | ECZ | KTZ | MCZ | FCZ | |
| <i>C. albicans</i> (ATCC 90029) | 24 de ore | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019) | 48 de ore | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |

12 - CAUZE DE EROARE
 • Prepararea unui inocul prea bogat sau prea slab.
 • Prepararea unui inocul pornind de la un amestec de cultură sau cu colonii izolate pe perioade mai mari de 48 de ore.
 • Citirea galeriei în lipsa unui viraj de culoare în godeurile de control de creștere.
 • Citirea galeriei la 24 sau 48 de ore după virajul de culoare în godeurile de control de creștere.
 Și, în general, nerespectarea recomandărilor din prezentul aviz.

13 - LIMITELE METODEI
 • Această metodă de determinare *in vitro* a rezistenței la antifungice are valoare orientativă cu privire la interacțiunea cuplului antifungic-levuri în urma tratamentelor *in vivo* (2, 4).
 • Metoda CANDIFAST a fost dezvoltată pentru identificarea și detectarea rezistenței tulinilor de origine cutaneo-mucoasă și, în consecință, nu este recomandată pentru tulpinile izolate de micete sisteme.
 • Metoda CANDIFAST nu permite o categorisire pe criteriile Sensibil - Intermediar - Rezistent.
 • Tulpinile termosensibile izolate la 20°C cresc diferit la 37°C; în acest caz, fie levurile nu vor crește, fie nu vor crește bine iar identificarea precum și evidențierea rezistenței la anumite antifungice nu vor putea fi realizate.
 • Pentru anumite tulpini de *C. lusitanae*, o întârziere de creștere în godeurile TRE nu permite identificarea prin citirea tabelului. Țineți cont de indicațiile de pe etichetă.
 • Pentru anumite tulpini de *C. glabrata*, dificultatea de citire a caracterului GAL nu permite identificarea cu ajutorul tabelului. Țineți cont de indicațiile de pe etichetă.
 • Interpretarea rezultatelor testelor de rezistență nu trebuie să țină cont de tulburare, un strat care se poate crea după incubație în cazul antifungicelor izolate.

14 - PERFORMANȚE
Studii pe tulpini de colecție
 Studiul a fost realizat pe 80 de tulpini de colecție (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* și 1 *Trichosporon cutaneum*.)
 78 de tulpini au fost identificate corect prin citirea cu ajutorul etichetei, fie 97,5% de concordanță în raport cu metoda FUNGICHROM a ELITECH MICROBIO sau API 32C a Biomerieux.
 Concordanța globală a testului de rezistență, în comparație cu FUNGITEST de Biorad și cu galeria ATB Fungus de Biomerieux este de 87,4%.
Studiu pe tulpini clinice
 Studiul a fost realizat pe 100 de tulpini izolate de curând, provenind din probe clinice (72 *Candida albicans*, 9 *C. glabrata*, 8 *C. parapsilosis*, 5 *C. tropicalis*, 3 *C. krusei*, 1 *C. kefyr*, 1 *C. inconspicua* și 1 *Saccharomyces spp.*)
 98 de tulpini au fost identificate corect în raport cu sistemul VITEK al Biomerieux.
 Concordanța globală a testului de rezistență, în comparație cu FUNGITEST al Biorad și cu galeria ATB Fungus a Biomerieux este de 98,5%. Primetele cele 10 discrepante, 3 sunt discrepante majore și 7 sunt discrepante minore. Aceste discrepante se aplică în cazul a 4 tulinii (2 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* și 1 *C. tropicalis*) și 3 antifungice printre care enumerăm econazol (2 RII și 1 R/S), ketonazol (1 RII și 2 R/S) și miconazol (4R/S).

15 - ELIMINAREA DEȘEURILOR
 Deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu regulile de igienă și reglementările naționale în vigoare referitoare la acest tip de reactivi.

16 - BIBLIOGRAFIE
 1. DUPONT A. 1987. Resistance de Canada aux antifongiques. Encyclopedie Medico-Chirurgicale, Chap. 4, 23/26.
 2. DUPOUY-CAMET J., M.-E. BOUGNOUX, I. VICENS și C. TOURTE-SCHAEFER. 1989. Interests et limites de l'antifongogramme. Rev. Fr. Lab. 197:69-72.
 3. GRILLON F., B. LEBEAU și J. SELBMAN. 1989. Isolement et identification des levures, donnees recente set perspectives. Rev.Fr.Lab. 197:24-32.
 4. PAUGAM A. 1996. Interet de l'etude *in vitro* de la sensibilité des levures aux antifongiques. Rev.Fr.Lab 282:157-159.
 5. KOENIG H., J. WALLER și M. KREMER. 1989. Diagnostic și aspecte epidemiologice pentru cele 70 000 de levuri izolate în 8 ani. Rev.Fr.Lab. 197:34-38.

ELITECH MICROBIO
 Parc d'activités du plateau
 19, allée d'Athènes
 83870 SIGNES (FRANCE)
 Tel: 33 (0)4 94 88 55 00
 Fax: 33 (0)4 94 88 55 22