CANDIFAST®

Идентификации дрожжевых грибов и тест на резистентность к противогрибковым препаратам

8 тестов (Кат. N°44008) **30 тестов** (Кат. N°44030)

CANDIFAST® *ES TWIN*

Резистентность дрожжевых грибов к противогрибковым препаратам

30 тестов (Кат. N°44130)

RU-2009-03_CPB 0038

1 – ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор CANDIFAST предназначен для идентификации основных патогенных дрожжевых грибов человека, а также для проведения теста на резистентность к различным противогрибковым препаратам.

CANDIFAST ES *Twin* – это набор для проведения теста на резистентность дрожжевых грибов к различным противогрибковым препаратам.

2 - ВВЕДЕНИЕ

За последние 10 лет значительно увеличилось число грибковых инфекций, и особенно тех, которые вызваны дрожжевыми грибами (5). Дрожжевые грибы являются условно-патогенными микроорганизмами. Большая их часть – это сапрофиты, которые при благоприятных условиях в организме носителя становятся патогенными. Такими условиями, в основном, являются физиологические факторы (новорожденные, старые люди, беременные женщины), местные факторы (опрелости, мацерации), патологические факторы (рак, иммунодефицит, нарушения обмена веществ), факторы, связанные с терапевтически лечением (антибиотики, противозачаточные таблетки, иммуносупрессорные средства, ионизирующее облучение, хирургические операции). Клинические признаки, вызванные этими дрожжевыми грибами, совершенно различные: состояние кожи (интертригинозный дерматит, вросший ноготь), слизисто-кожные нарушения (кандидоз ротовой полости, колит, вагиниты), висцеральные условия и септицемия.

Увеличение количества имеющихся противогрибковых препаратов и появление грибковых заболеваний, которые не поддаются лечению, доказывает необходимость тестирования восприимчивости дрожжевых грибов к противогрибковым препаратам (1, 2).

3 - ПРИНЦИП

Идентификация дрожжевых грибов основывается:

• на чувствительности тестируемого штамма к актидиону, который становится видимым за счет изменения цвета индикатора – в желтый, светло-оранжевый цвет, либо цвет фуксии;

• на ферментации семи сахаров, которая становится видимой за счет изменения цвета индикатора на желтый или светло-оранжевый цвет из-за окисления среды;

• на демонстрации активности уреазы, которая подщелачивает среду, в результате чего индикатор изменяет свой цвет на цвет фуксии;

Определение резистентности дрожжевых грибов к противогрибковым препаратам основывается на росте или отсутствии роста этих дрожжевых грибов в присутствии противогрибковых препаратов. Рост демонстрируется изменением цвета среды:

• ферментация глюкозы дрожжевыми грибами, которая ведет к окислению среды, содержащей фенол красный, изменяет ее цвет на желтый или светло-оранжевый;

• гидролиз мочевины уреаза-положительными дрожжевыми грибами, при котором высвобождающийся аммиак подщелачивает среду, содержащую фенол красный, изменяя ее цвет на цвет фуксии-розовый.

4 - РЕАГЕНТ

Упаковка	Количество		
Реагент	**#44008**	**#44030**	**#44130**
CANDIFAST	8	30	-
CANDIFAST *ES Twin*	-	-	15
R1: флакон с Реагентом 1	10	35	35
R2: флакон с Реагентом 2	8	30	30
TC: флакон для проверки мутности	1	1	1

Описание

CANDIFAST: плашка с 20 лунками, готовая к использованию.

На каждой плашке можно провести анализ только одной пробы (идентификация + тест на резистентность).

- Ряд идентификации

В лунке 1 находится фенол красный, актидион (ACT) и глюкоза,

в лунках со 2 по 8 находится фенол красный и различные сахары, а именно:

в лунке 2 (GLU) : глюкоза
в лунке 3 (GAL) : галактоза
в лунке 4 (TRE) : трегалоза
в лунке 5 (MAL) : мальтоза
в лунке 6 (CEL) : целлобиоза
в лунке 7 (RAF) : рафиноза
в лунке 8 (LAC) : лактоза
лунки 9 и10 пустые

- Ряд теста на резистентность

В лунке 1 находится контрольная лунка роста (C+)

в лунках со 2 по 8 находятся различные противогрибковые препараты в следующей последовательности:

в лунке 2 (AB) : амфотерицин B (4 мг/мл)
в лунке 3 (NY) : нистатин (200 ед./мл)
в лунке 4 (FCT) : флюкотазин (35 мг/мл)
в лунке (ECZ) : эконозол (16 мг/мл)
в лунке 6 (KTZ) : кетоконазол (16 мг/мл)
в лунке 7 (MCZ) : миконазол (16 мг/мл)
в лунке 8 (FCZ) : флюконазол (16 мг/мл)
лунки 9 и10 пустые

CANDIFAST ES *Twin*: плашка с 2 х 20 лунками, готовая к использованию. Два ряда лунок идентичные ряду плашки теста на резистентность CANDIFAST.

На каждой плашке можно провести анализ двух проб (только тесты на резистентность)

R1: 4-мл флакон с буферной средой агара для разбавления и идентификации.

Мясной экстракт 1,3 г/л, казеин пептон 1,8 г/л, дрожжевой экстракт 0,8 г/л, аминокислоты, витамины, минеральные вещества 5,75 г/л, мочевина 20 г/л, агар 0,52 г/л, антибиотик 1,12 г/л. pH: 6,05 ± 0,1.

R2: 2-мл флакон с средой YNB - азотистые основания дрожжей, содержащей мочевину и фенол красный для проведения теста на резистентность.

Мясной экстракт 1,3 г/л, казеин пептон 1,8 г/л, дрожжевой экстракт 0,8 г/л, аминокислоты, витамины, минеральные вещества 8,75 г/л, мочевина 20 г/л, глюкоза 8,5 г/л, фенол красный 0,052 г/л, антибиотик 1,16 г/л. pH: 7,3 ± 0,1.

TC: 4-мл флакон с раствором сульфата бария.

5 – МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

• Данные реагенты предназначены исключительно для *in vitro* использования и работу с ними должен проводить только персонал, имеющий на это разрешение.

• Пробы и реагенты посева могут вызвать инфекцию, поэтому с ними необходимо обращаться с осторожностью, соблюдая правила и требования гигиены для работы с подобными препаратами, предусмотренные в стране пользователя.

• Реагенты, содержащие сырье животного происхождения, нужно обрабатывать с осторожностью.

• Нельзя использовать реагенты после истечения срока их годности.

• Нельзя использовать реагенты, которые испорчены или неправильно хранились до использования

6 - СБОР ОБРАЗЦОВ

Колонии, используемые для идентификации и теста не резистентность должны быть молодыми (от 24 до 48 часов) и тщательно изолированными при комнатной температуре или при 37°C в среде агара, желательно в чашках Петри. Рекомендуется делать изоляцию на средах, которые характерны для дрожжевых грибов (3).

7 – ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Набор и его компоненты во время хранения при 2-8°C в их оригинальном состоянии сохраняют стабильность до даты истечения срока годности, указанной на упаковке.

Половина набора CANDIFAST *ES Twin* может храниться при температуре от 2 до 8°C в течение 7 дней, в своей оригинальной упаковке или запечатанной с десикантом (осушителем) внутри.

8 – НЕОБХОДИМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ НЕ ПОСТАВЛЯЮТСЯ

• Парафиновое масло
• Стерильные пипетки
• Инкубатор с t 37°C
• Контейнер для загрязненных отходов

9 - ПРОЦЕДУРА

Позволяет достичь комнатной температуры реагентов (18-25°C) перед их использованием

9.1. Подготовка посевного материала (инокулята)

Собрать изолированную колонию с помощью проволочной петли или пастеровской пипеткой. Посеять инокулят из флакона Реагента 1 с колонией. Тщательно перемешать.

Стандартизацию посевного материала можно выполнить тремя различными способами:

• С помощью контроля помутнения

Добиться такой же непрозрачности инокулированного Реагента 1, как и во флаконе контроля помутнения, пользуясь черными линиями, нанесенными на этикетку флаконов.

Если Реагент 1 светлее (недостаточно посевного материала), то нужно добавлять инокулят во флакон до тех пор, пока полученная непрозрачность будет такой же, как и во флаконе контроля помутнения.

Если Реагент 1 более мутный (слишком много посевного материала), то нужно разбавлять его Реактивом 1 из другого только что открытого флакона, пока нужное помутнение не будет получено.

• С помощью денситометра

Убедиться с помощью денсиметра, что помутнение Реагента 1 с инокулятом соответствует 1 ЕД по стандарту Мак-Фарланда (McFarland). При необходимости, поступать, как описано выше, чтобы отрегулировать помутнение.

• С помощью подсчета в клетке Малассеза (Malassez)

Посевной материал можно стандартизировать методом подсчета дрожжевых грибков в клетке Малассеза. Необходимо получить раствор 2 500 – 3 500 дрожжевых грибов на мм^3.

9.2a. Инокуляция плашки CANDIFAST

Ряд идентификации

Пометить тест-плашку для идентификации тестируемых проб. Приподнять липкую ленту и внести в каждую из первых 8 лунок следующий состав:
- 100 мкл инокулированного стандартизованного Реагента 1 (R1)
- 2 капли парафинового масла

Вновь заклеить тест-плашку липкой лентой

Ряд теста на резистентность

Сначала инокулировать Реагент 2 , внеся 100 мкл инокулированного стандартизованного Реагента 1 (см. § 9.1).

Затем приподнять липкую ленту и внести в каждую из первых 8 лунок следующий состав:
- 100 мкл инокулированного стандартизованного Реагента 2 (R2)
- 2 капли парафинового масла

Вновь заклеить тест-плашку липкой лентой

(2 пустые лунки)

9.2b. Инокуляция плашки CANDIFAST ES *Twin*

Первый ряд пробы

Инокулировать Реагент 2 (R2), внеся 100 мкл (µl) инокулированного стандартизованного Реагента 1.

Пометить этикетками оба ряда на плашке.

Приподняв липкую ленту, внести в каждую из первых 8 лунок следующий состав:
- 100 мкл инокулированного Реагента 2 (R2)
- 2 капли парафинового масла

Второй ряд пробы

Инокулировать аналогичным образом второй ряд, используя дополнительный флакон с инокулированным Реагентом 2, как описано выше.

Плотно заклеить тест-плашку липкой лентой.

9.3. Инкубация

Инкубировать тест-плашку при 37°C в течение 24 часов; при необходимости и в зависимости от штаммов, процесс инкубации можно продлить до 48 и даже до 72 часов. Как только дрожжевые грибы выросли в контрольной лунке, можно считывать плашку.

10 – СЧИТЫВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Считать каждую тест-плашку целиком только в случае, если в контрольной лунке (C+: лунка 1 ряда теста на резистентность) имеет место изменение цвета среды следующим образом:

- цвет изменяется на желтый, светло-оранжевый желтый или цвет фуксии* (*для семейства уреаза положительных).

10.1. Ряд идентификации

Лунка 1 - (ACT- актидион)

Характеристика положительная, если наблюдается изменение цвета среды:

-цвет изменяется на желтый, светло-оранжевый желтый или цвет фуксии.

Характеристика отрицательная, если не наблюдается изменение цвета среды на желтый, светло-оранжевый желтый или цвет фуксии.

Лунки со 2 по 8 (GLU to RAF- от глюкозы до рафинозы)

Характеристика положительная, если наблюдается изменение цвета среды:

- цвет изменяется на желтый, светло-оранжевый желтый или цвет фуксии.

Характеристика отрицательная, если не наблюдается изменение цвета среды на желтый, светло-оранжевый желтый или цвет фуксии.

Идентификацию дрожжевых грибов выполняют с помощью плашки CANDIFAST параллельно с анализом морфологических признаков колоний.

Для интерпретации результатов можно пользоваться таблицей ниже или диаграммой, прилагаемой к набору.

Можно также пользоваться маркировками на липкой ленте тест- плашки: **считывать лунки с актидионом в первую очередь; затем определить местоположение последней лунки с положительным результатом справа от нее.** Название микроорганизма напечатано на липкой ленте на пересечении актидион положительного (нижний ряд) или актидион отрицательного (верхний ряд) признаков и местоположения сахара.

Дрожжевые грибы	АКТИДИОН	ГЛЮ	ГАЛ	ТРЕГАЛ	МАЛЬТ	ЦЕЛЛОБИАЗА	РАФИНОЗА	ЛАКТОЗА
Candida albicans	+	+	+	v	+	-	-	-
Candida albicans (var stellatoïdea)	+	+	-	v	+	-	-	-
Candida glabrata	v	+	-	+	-	-	-	-
Candida kefyr	+	+	+	-	-	-	v	+
Candida krusei	v	+	-	-	-	-	-	-
Candida lusitaniae	-	+	+	+	v	+	-	-
Candida parapsilosis	-	+	+	-	v	-	-	-
Candida tropicalis	-	+	+	+	+	-	-	-
Saccharomyces	-	+	+	v	v	v	+	-
Cryptococcus или *Trichosporon* или семейства *Rhodotorula*	v				уреаза положительный			

• Дифференциальный диагноз

Виды *Cryptococcus*, *Trichosporon* и *Rhodoturola* можно дифференцировать с помощью исследования морфологии.

- *Виды Rhodoturola* характеризуются своеобразными оранжево-красными колониями при росте на декстрозном агаре Сабуро.
- Некоторые штаммы видов *Cryptococcus* также могут давать красноватую пигментацию. Таким образом, виды *Cryptococcus* следует изучить на наличие капсулы с помощью препарата с индийской тушью.
- Виды *Trichosporon* производят псевдогифы при росте в среде PCB (ПХБ - полихлорированный бифенил) агара.

Примечание

• Среди *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae* есть основные виды человеческих патогенов.

• Штаммы *Saccharomyces boulardii* или *Saccharomyces cerevisiae* можно изолировать у пациентов, проходящих лечение от дрожжевых грибков.

• С помощью микроскопических исследований можно дифференцировать два вида:

-*S. cerevisiae* – большие шарообразные дрожжевые грибы.

-*S. boulardii* – меньшего размера, яйцеподобные или вытянутой формы.

• При проведении теста с набором CANDIFAST некоторые штаммы *Cryptococcus* могут расти в присутствии актидиона.

10.2. Ряд теста на резистентность

Лунки со 2 по 8 (от амфотерицина (AB) до флюконазола (FCZ)

Изменение цвета среды на желтый, светло-оранжевый желтый или цвет фуксии свидетельствует о том, что тестируемые штаммы способны расти в этой лунке, и, таким образом, проявляется резистентность к имеющемуся противогрибковому препарату.

Если цвет лунки остается светло-оранжевого красного цвета, то рост тестируемого штамма подавляется противогрибковым препаратом в этой лунке.

11 – КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Стандартизацию метода время от времени рекомендуется проверять с помощью эталонных штаммов, *Candida albicans* ATCC 90029 и *Candida parapsilosis* ATCC 22019**.

Штаммы	Инкубация	Ожидаемые результаты															
		ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC	C+	AB	NY	FCT	ECZ	KTZ	MCZ	FCZ
C.albicans (ATCC 90029)	24 часа	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
C.parapsilosis (ATCC 22019)	48 часов	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

GLU – глюкоза; GAL – галактоза; TRE- трегалоза; MAL –мальтоза; CEL – целлобиоза; RAF – раффиноза; LAC – лактоза.

AB - амфотерицин B; NY – нистатин; FCT – флюкотазин; ECZ – эконозол; KTZ - кетоконазол; MCZ – миконазол; FCZ – флюконазол.

12 – ПРИЧИНЫ ПОГРЕШНОСТЕЙ

• Подготовленный посевной материл – инокулят либо сильно концентрированный, либо недостаточной концентрации.

• Подготовленный инокулят из смешанной культуры или с изолированными колониями, выращенными более 48 часов.

• Плашку считывали до появления изменений цвета индикатора роста.

• Плашку не считывали после инкубации в течение 24 или 48 часов, даже при том что индикатор роста был положительным.

В общем, несоблюдение рекомендаций, содержащихся в инструкциях.

13 – ОГРАНИЧЕНИЯ

• Данный in vitro метод для определения резистентности к противогрибковым препаратам имеет индикационное значение при взаимодействии противогрибковых препаратов и дрожжеподобных грибов во время in vivo лечения (2, 4).

• Процедура CANDIFAST предназначена для идентификации и тестирования резистентности к противогрибковым препаратам только тех дрожжевых грибов, которые вызывают кожно-слизистый кандидоз. Таким образом, нельзя эту процедуру использовать для штаммов грибов, вызывающих системные микозы.

• Процедура CANDIFAST не позволяет разделить штаммы на три категории: чувствительные (Ч) - промежуточные (П) – устойчивые (У).

• Некоторые термочувствительные штаммы, изолированные при температуре 20°C, растут иначе, чем изолированные при 37°C. В этом случае дрожжевые грибы либо не будут расти, либо будут расти плохо. Как следствие этого, выполнить надежную идентификацию или добиться их резистентности к определенным противогрибковым препаратам будет очень трудно, если вообще возможно.

• Для определенных штаммов C. lusitaniae задержка роста в лунке с трегалозой (TRE) делает идентификацию по прилагаемой таблице труднодостижимой. Идентификацию можно выполнить также с помощью маркировок на липкой ленте тест-плашки.

• Для определенных штаммов C. glabrata трудность считывания признаков галактозы (GAL) делает идентификацию по прилагаемой таблице труднодостижимой. Идентификацию можно выполнить также с помощью маркировок на липкой ленте тест-плашки.

• Интерпретация результатов теста на резистентность не принимает в расчет помутнение среды, которое может появиться после инкубации с -азол (-azole) противогрибковыми препаратами.

14 - ХАРАКТЕРИСТИКИ

Коллекционные штаммы

Исследования проводили с помощью коллекции из 80 штаммов (31 - Candida albicans, 17 -C. glabrata, 11 - C. tropicalis, 6 - C. lusitaniae, 3 - C. parapsilosis, 2 - C. kefyr, 2 - C. krusei, 5 - Saccharomyces spp., 2 - Cryptococcus neoformans и 1 - Trichosporon cutaneum).

78 штаммов были правильно идентифицированы с помощью маркировок на липкой ленте тест-плашки и дали совпадение 97,5% с методом ELITech MICROBIO FUNGICHROM и методом Biomérieux API 32C. Общее совпадение для теста на резистентность при сравнении с Biorad FUNGITEST и плашкой Biomérieux ATB Fungus составляло 87,4%.

Клинические штаммы

Исследования проводили со 100 свежеизолированными штаммами из клинических проб, взятых у пациентов в лечебных заведениях (72 - Candida albicans, 9 - C. glabrata, 8 - C. parapsilosis, 5 - C. tropicalis, 3 - C. krusei, 1 - C. kefyr, 1 - C. inconspicua и 1 - Saccharomyces spp).

98 штаммов были правильно идентифицированы в сравнении с методом Biomérieux VITEK.

Общее совпадение для теста на резистентность сравнимо с Biorad FUNGITEST и плашкой Biomérieux ATB Fungus и составило 98,5%. Среди 10 расхождений 3 – существенные ошибки и 7 – несущественные. Эти расхождения касались 4 штаммов (2 - C. glabrata, 1 - C. parapsilosis и 1 - C. tropicalis), а 3 – противогрибковых препаратов: эконазола (2 Р/П и 1 Р/Ч), кетоконазола (1 Р/П и 2 Р/Ч) и миконазола (4 Р/П).

15 – УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Отходы следует уничтожать в соответствии с санитарно-гигиеническими требованиями и применяемыми правилами для данных видов продуктов в стране применения.

16 - ЛИТЕРАТУРА

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.GRILLOT 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 isolées en 8 ans. Rev. Fr. Lab. 197: 34-38.

CANDIFAST® является торговой маркой компании ELITech MICROBIO.

ATCC ** - Американская коллекция типовых культур микроорганизмов

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du plateau
19, allée d'Athènes
83870 SIGNES, FRANCE
Tel. +33 4 94 88 55 00
Fax : 33 4 94 88 55 22