CANDIFAST

Identyfikacja drożdżaków i badanie oporności na środki przeciwgrzybicze
8 testów (nr ref. 44008) **30 testów** (nr ref. 44030)

CANDIFAST *ES TWIN*

Badanie odporności drożdżaków na środki przeciwgrzybicze
30 testów (nr ref. 44130)

CPB 0038-PL-2009-03
Wyłącznie do użytku diagnostycznego *in vitro*, wyłącznie do użytku profesjonalnego.
Testy jednorazowego użytku.

CE

1 - ZNACZENIE

Zestaw CANDIFAST służy do identyfikacji kluczowych drożdżaków o znaczeniu medycznym i badania ich oporności na różne środki przeciwgrzybicze. Zestaw CANDIFAST *ES TWIN* służy do badania odporności drożdżaków na różne środki przeciwgrzybicze.

2 - WPROWADZENIE

Liczba infekcji grzybiczych, zwłaszcza drożdżyc, znacznie wzrosła w ciągu ostatniej dekady (5). Drożdżaki są czynnikami o charakterze oportunistycznym. Większość z nich to saprofity, ale mogą stać się patogenami, jeśli warunki panujące u żywiciela są sprzyjające. Chodzi głównie o czynniki fizjologiczne (noworodki, osoby starsze, kobiety w ciąży), czynniki miejscowe (tarcie, maceracja), czynniki patologiczne (nowotwory, niedobór odporności, zaburzenia metaboliczne...), czynniki jatrogenne (antybiotykoterapia, tabletki antykoncepcyjne, leki immunosupresyjne, promieniowanie jonizujące, zabiegi chirurgiczne). Objawy kliniczne wywoływane przez te drożdżaki są bardzo zróżnicowane: choroby skóry (odparzenie, onyksja itp.), choroby błon śluzowych (pleśniawki, zapalenie przełyku, zapalenie okrężnicy, zapalenie pochwy itp.), choroby trzewne i posocznica.
Wzrost liczby preparatów grzybobójczych oraz występowanie chorób grzybiczych opornych na leczenie uzasadniają ocenę zachowania drożdżaków w stosunku do środków przeciwgrzybiczych (1, 2).

3 - ZASADA

Identyfikacja drożdżaków opiera się na:
- wrażliwości lub jej braku na jony aktydu, wizualizowanej przez zabarwienie wskaźnika na żółto, żółtopomarańczowo lub fuksję,
- badaniu fermentacji siedmiu cukrów wizualizowanej przez odbarwienie pożywki na żółto lub żółtopomarańczowo w wyniku zakwaszenia pożywki,
- odkryciu aktywności ureazy, która alkalizuje pożywkę i powoduje zabarwienie wskaźnika na fuksjowy.

Określenie oporności drożdżaków na środki przeciwgrzybicze opiera się na stwierdzeniu, czy drożdżaki te rosną w obecności różnych środków przeciwgrzybiczych. Wzrost ten obrazuje zmiana koloru pożywki:
- fermentacja glukozy przez drożdżaki powoduje zakwaszenie pożywki, co powoduje zmianę czerwieni fenolowej na żółty lub żółtopomarańczowy.

4 - ODCZYNNIKI

Kondycjonowanie:

Odczynnik	**Liczba**		
	#44008	**#44030**	**#44130**
CANDIFAST	8	30	-
CANDIFAST *ES Twin*	-	-	15
R1 : : fiolka Odczynnika 1	10	35	35
R2 : fiolka Odczynnika 2	8	30	30
TC : fiolka do kontroli zmętnienia	1	1	1

Opis:

CANDIFAST:galeria 20 baseników gotowych do użycia
Każda galeria umożliwia badanie jednej próbki (identyfikacja + test oporności)

Seria do identyfikacji
Basenik 1 zawiera aktidion (ACT), glukozę i czerwień fenolową.
baseniki od 2 do 8 zawierają różne cukry i czerwień fenolową
basenik 2: (GLU) glukoza
basenik 3: (GAL) galaktoza
basenik 4: (TRE) trehaloza
basenik 5: (MAL) maltoza
basenik 6: (CEL) celobioza
basenik 7: (RAF) rafinoza
basenik 8: (LAC) laktoza
baseniki 9 i 10 są puste.

Direnç testi için seriler
Basenik 1 jest basenikiem kontroli wzrostu (C+). Baseniki 2-8 zawierają różne środki przeciwgrzybicze: basenik 2 (AB): amfoterycyna B (4 µg/mL) basenik 3 (NY): nystatyna (200 jednostek/mL)
basenik 4 (FCT): flucytozyna (35 µg/mL)
basenik 5 (ECZ): ekonazol (16 µg/mL)
basenik 6 (KTZ): ketokonazol (16 µg/mL)
basenik 7 (MCZ): mikonazol (16 µg/mL)
basenik 8 (FCZ): flukonazol (16 µg/mL)
baseniki 9 i 10 są puste.

CANDIFAST *ES Twin*: galeria 2x10 baseników gotowych do użycia
Dwa zestawy baseników odpowiadają testowi odporności galerii CANDIFAST.
W każdej galerii można przetestować dwie próbki (tylko testy odporności)

R1 - fiolka 4 mL buforowanej pożywki półagarowej do identyfikacji i rozcieńczenia.
Ekstrakt wołowy 1,3 g/L, pepton kazeinowy 1,8 g/L, ekstrakt drożdżowy 0,8 g/L, aminokwasy, witaminy, minerały 5,75 g/L, mocznik 20 g/L, agar 0,52 g/L, antybiotyki 1,12 g/L. pH: 6,05 ± 0,1.

R2 : 2 ml fiolka z płynną pożywką do testu odporności.
Ekstrakt wołowy 1,3 g/L, pepton kazeinowy 1,8 g/L, ekstrakt drożdżowy 0,8 g/L, aminokwasy, witaminy, minerały 8,75 g/L, mocznik 20 g/L, glukoza 8,5 g/L, czerwień fenolowa 0,052 g/L, antybiotyki 1,16 g/l. pH: 7,3 ± 0,1.

TC: 4 ml fiolka siarczanu baru do kontroli rozcieńczenia

5 - ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Odczynniki w tym zestawie są przeznaczone do zastosowania *in vitro* i powinny być stosowane przez upoważniony personel.
- Testy są do jednorazowego użytku.
- Próbki i zaszczepione odczynniki mogą być zakaźne i należy się z nimi obchodzić z zachowaniem zwykłych środków ostrożności, biorąc pod uwagę zasady dotyczące higieny i przepisy obowiązujące dla tego typu produktów w kraju użytkowania.
- Z odczynnikami zawierającymi surowce pochodzenia zwierzęcego należy obchodzić się ostrożnie.

6 - POBIERANIE PRÓBEK

Identyfikację i test odporności należy przeprowadzić z kolonii:
- młode kolonie (24 do 48 godzin)

- doskonale izolowane kolonie w temperaturze pokojowej lub 37 °C na POŻYWCE agarowEJ, najlepiej na szalce Petriego.
Zaleca się wykonanie izolacji na określonych drożdżakach (3).

7 - PRZECHOWYWANIE ODCZYNNIKÓW

Odczynniki przechowywane w oryginalnym stanie w temperaturze 2-8°C są stabilne do daty ważności podanej na etykiecie.
Niewykorzystaną półgalerię CANDIFAST ES *Twin* można przechowywać przez 7 dni w temperaturze 2-8°C w oryginalnym, hermetycznie zamkniętym opakowaniu z saszetką ze środkiem osuszającym.

8 - ODCZYNNIK I MATERIAŁ WYMAGANY, ALE NIE DOSTARCZONY

- Olej parafinowy
- Inkubator w 37 °C
- Sterylne pipety
- Pojemnik na odpady skażone

9 - METODA

Przed użyciem doprowadzić odczynniki do temperatury pokojowej (18-25°C).

9.1. Przygotowanie inokulum

Zbierz wyizolowaną kolonię za pomocą pipety uszczelniającej lub pasteurowskiej. Następnie przelej ją do fiolki z odczynnikiem.
1. Homogenizuj. Standaryzację inokulum można osiągnąć na kilka sposobów:

• Do porównania z fiolką TC do testu zmętnienia

Dostosuj zmętnienie Odczynnika 1 do fiolki TC, używając czarnych linii na etykietach fiolki.
Jeśli Odczynnik 1 jest bardziej klarowny (niewystarczająca ilość inokulum), ponownie zaszczep fiolkę, aż zmętnienie zrówna się z fiolką TC.
Jeśli Odczynnik 1 jest bardziej mętny (zbyt bogaty w inokulum), rozcieńcz w nowej fiolce Odczynnik 1, aż do uzyskania prawidłowego zmętnienia.

• Korzystanie z densytometru

Za pomocą densytometru sprawdź, czy zmętnienie zaszczepionego Odczynnika 1 jest równe 1 Mac Farland. W razie potrzeby postępuj zgodnie z wcześniejszymi zaleceniami, aby dostosować zmętnienie.

• Liczba komórek Malasseza

Istnieje możliwość standaryzacji inokulum poprzez zliczenie drożdżaków w komórce Malasseza. Należy uzyskać roztwór z 2500 do 3500 drożdżakami na mm^3.

9.2a. Zaszczepienie galerii CANDIFAST *Seria do identyfikacji*

Zidentyfikuj galerię. Podnieś etykietę samoprzylepną, a następnie podziel na każdy z pierwszych 8 baseników:
- 100 µL zaszczepionego i znormalizowanego R1
- 2 krople oleju parafinowego.

Ponownie przykryj serię baseników etykietą samoprzylepną.

Seria do testu odporności

Najpierw zaszczep Odczynnik 2 na 100 µl zaszczepionego i znormalizowanego Odczynnika 1 (patrz §9.1). Następnie podnieś samoprzylepną etykietę i podziel na każdy z pierwszych 8 baseników:
- 100 µl wstępnie zaszczepionego R2
- 2 krople oleju parafinowego.

Ponownie przykryj serię baseników etykietą samoprzylepną.

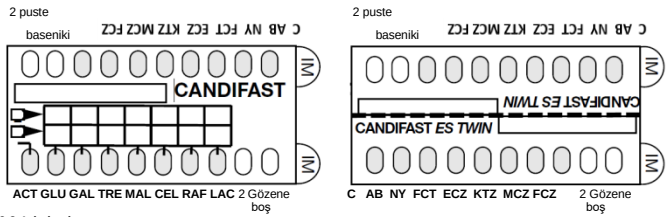
9.2b. Inokulacja galerii CANDIFAST ES *Twin Seria dla pierwszej próbki*

Zaszczep odczynnik R2 100 µl zaszczepionego i znormalizowanego odczynnika R1.
Dobrze zidentyfikuj każdą stronę galerii.
Podnieś etykietę samoprzylepną, a następnie podziel na każdy z pierwszych 8 baseników:
- 100 µl wstępnie zaszczepionego odczynnika 2
- 2 krople oleju parafinowego.

Ponownie przykryj serię baseników etykietą samoprzylepną.

Sekwencja dla drugiej próbki

Zaszczep drugą serię w ten sam sposób w innej fiolce wstępnie zaszczepionego Odczynnika 2, jak opisano powyżej.
Ponownie przykryj serię baseników etykietą samoprzylepną.



9.3. Inkubacja

W razie potrzeby inkubuj galerię w 37 °C przez 24 godziny i, w zależności od szczepu, kontynuuj inkubację przez 48 lub 72 godziny. Odczytaj galerię, gdy drożdżaki wyrosły w baseniku kontrolnym.

10 - ODCZYTYWANIE I INTERPRETACJA GALERII

Odczytaj całą galerię tylko w przypadku zaobserwowania zmiany koloru pożywki w baseniku kontrolnym (C+: basenik 1 serii testów odporności):

- ***przebarwienie na żółto, żółtopomarańczowo lub fuksję* (*dla dodatnich rodzajów ureazy) 10.1 Seria do identyfikacji***

Basenik 1 (ACT)

Znak jest pozytywny, gdy w baseniku ACT obserwuje się zmianę koloru pożywki:

- ***Przebarwienia na żółto, żółtopomarańczowo lub fuksję***

Negatywny charakter skutkuje brakiem zabarwień na żółto, żółtopomarańczowo lub fuksję.

Baseniki 2-8 (GLU do RAF)

Znak jest pozytywny, gdy obserwuje się zmianę koloru pożywki w jednym z tych baseników:

- ***Zabarwienie na żółto, żółtopomarańczowo lub fuksję***

• Nie używaj odczynników po upływie terminu ważności.
• Nie używaj uszkodzonych lub odczynników, które były nieprawidłowo przechowywanych przed użyciem.

Drożdżak	ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC
Candida albicans	+	+	+	v	+	-	-	-
Candida albicans (var stellatoidea)	+	+	-	v	+	-	-	-
Candida glabrata	v	+	-	+	-	-	-	-
Candida kefyr	+	+	+	-	-	-	v	+
Candida krusei	v	+	-	-	-	-	-	-
Candida lusitaniae	-	+	+	+	v	+	-	-
Candida parapsilosis	-	+	+	-	v	-	-	-
Candida tropicalis	-	+	+	+	+	-	-	-
Saccharomyces	-	+	+	v	v	v	+	-
Rodzaje *Cryptococcus lub* *Trichosporon* lub *Rhodotorula*	v				dodatnia ureaza			

• Diagnostyka różnicowa

Rodzaje *Cryptococcus*, *Trichosporon* oraz *Rhodotorula* można odróżnić od siebie cechami morfologicznymi.
- *Rhodotorula* daje charakterystyczne łososiowoczerwone kolonie na agarze Sabourauda.
- *Cryptococcus* posiada polisacharydową otoczkę reprezentowaną przez przebarwienie tuszem chińskim w rozcieńczeniu 1/5. Na Agar Sabourauda daje mniej intensywne kolonie łososiowoczerwone niż kolonie *Rhodoturola*.
- *Trichosporon* wykazuje pseudomycelium na pożywce PCB.

• Uwagi

• W rodzaju *Saccharomyces to Saccharomyces cerevisiae* jest głównym gatunkiem patogennym występującym u ludzi.
• Szczepy *Saccharomyces boulardiic* lub *Saccharomyces cerevisiae* można wyizolować od pacjentów poddawanych leczeniu drożdżakowemu.
• Badanie mikroskopowe pozwala rozróżnić dwa rodzaje:
  - *S. cerevisiae* to duże kuliste komórki drożdżaków.
  - *S. boulardii* to mniejsze, wydłużone, jajowate drożdżaki.
• Galeria CANDIFAST pozwala rosnąć niektórym szczepom *Cryptococcus* w obecności aktidionu.

10.2 serie do testu odporności

Baseniki 2-8 (AB do FCZ)

Zmiana barwy pożywki na żółtą, żółtopomarańczową lub fuksję odzwierciedla zdolność badanego szczepu do rozwoju przy badanym stężeniu środka przeciwgrzybiczego. W tym przypadku szczep stał się odporny.
Jednak pomarańczowoczerwony kolor pożywki wskazuje, że szczep został zahamowany przez środek przeciwgrzybiczy w osklepku.

11 - KONTROLA JAKOŚCI

W celu weryfikacji standaryzacji metody zaleca się okresowe przeprowadzanie kontroli jakości z wykorzystaniem szczepów referencyjnych, *C. albicans* ATCC 90029 i *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Suş	**İnkübasyon**	**Beklenen sonuçlar**															
		ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC	C+	AB	N	FCT	ECZ	KTZ	MCZ	FCZ
C. albikans (ATCC 90029)	24 saat	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
C. parapsilosis (ATCC 22019)	48 saat	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

12 - PRZYCZYNY BŁĘDÓW

- Przygotowanie zbyt bogatego lub zbyt słabego inokulum.
- Przygotowanie inokulum z mieszaniny kultur lub kolonii izolowanych przez ponad 48 godzin.
- Odczyt galerii bez zmiany koloru w basenikach w celu kontroli wzrostu.
- Odczyt z galerii 24 lub 48 godzin po zmianie koloru w basenikach monitorujących wzrost.

I ogólnie: niestosowanie się do zaleceń zawartych w tej instrukcji.

13 - OGRANICZENIA METODY

• Ta **metoda oznaczania** *in vitro* oporności na środki przeciwgrzybicze ma wartość wskaźnikową dla interakcji pary środka przeciwgrzybiczego z drożdżakami podczas *zabiegu in vivo* (2.4).
• Metoda CANDIFAST została opracowana w celu identyfikacji i wykrywania oporności szczepów występujących na błonach śluzowych skóry,
dlatego też metoda ta nie jest zalecana dla izolowanych szczepów ogólnoustrojowych chorób grzybiczych.
• Metoda CANDIFAST nie może być zaklasyfikowana jako wrażliwa-średnio-oporna.
• Wrażliwe na ciepło szczepy izolowane w 20°C rosną inaczej w 37°C; w tym przypadku drożdżaki nie będą rosły
lub będą rosły słabo, a identyfikacja i wykrycie oporności na niektóre środki przeciwgrzybicze nie będzie
mogło zostać wykonane.
• Dla niektórych szczepów *C. lusitaniae* opóźnienie wzrostu w basenikach TRE uniemożliwia identyfikację poprzez odczyt tabeli. Koniecznie przeczytaj etykietę.
Dla niektórych szczepion *C. glabrata* trudności w odczytaniu znaku GAL nie pozwalają na identyfikację za pomocą tabeli. Koniecznie
przeczytaj etykietę.
• Zmętnienia nie należy brać pod uwagę podczas interpretacji odczytów testu odporności; zasłona może pojawić się po inkubacja w przypadku przeciwgrzybiczych środków azolowych.

14 - WYNIKI

Badania nad szczepami kolekcjonerskimi

Badania przeprowadzono na 80 szczepach kolekcjonerskich (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* en 1 *Trichosporon cutaneum.*
78 szczepów zostało prawidłowo zidentyfikowanych na podstawie odczytu etykiety, tj. 97,5% zgodnie z metodą FUNGICHROM firmy ELITech MICROBIO lub API 32C firmy Biomérieux.
Ogólna zgodność testu odporności w porównaniu z FUNGITEST firmy Biorad i galerią ATB Fungus firmy Biomérieux wynosi 87,4%.

Badania nad klinicznymi szczepami

Badanie przeprowadzono na 100 świeżo wyizolowanych szczepach próbek klinicznych w medycynie miejskiej (72 *Candida albicans*, 9 *C. glabrata*, 8 *C. parapsilosis*, 5 *C.tropicalis*, 3 *C. krusei*, 1 *C. kefyr*, 1 *C. inconspicua* en 1 *Saccharomyces spp).*
98 szczepów zostało prawidłowo zidentyfikowanych w systemie Biomérieux VITEK.
Ogólna zgodność testu odporności w porównaniu z FUNGITEST firmy Biorad i galerią ATB Fungus firmy Biomérieux wynosi 98,5%.
Spośród 10 rozbieżności są 3 duże rozbieżności i 7 drobnych rozbieżności. Te rozbieżności obejmują 4 szczepy (2 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* i 1 *C. tropicalis*) i 3 środki przeciwgrzybicze, w tym ekonazol (2 R/I i 1 R/S), ketokonazol (1 R/I i 2 R/S) i mikonazol (4 R/S).

15 - UTYLIZACJA ODPADÓW

Atık, kullanım ülkesindeki bu tür reaktifler için geçerli olan hijyen kurallarına ve yönetmeliklerine uygun olarak ortadan kaldırılmalıdır.

16 - BIBLIOGRAFIA

1. DUPONT B. 1987. *Candida'nın* aantifungal direnci. Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Chap. 4, 23-26.
2. DUPOUY-CAMET J., M.-E. BOUGNOUX, I. VICENS ve C. TOURTE-SCHAEFER. 1989. Intérêts et limites de l'antifongigramme. Rev. Fr. Lab. **197**: 69-72.
3.GRILLOT R., B. LEBEAU ve I. SELBMANN. 1989. Mayaların izolasyonu ve tanımlanması, son veriler ve perspektifler. Rev. Fr. Lab. **197**:24-32.
4.PAUGAM A.. 1996. Intérêt de l'étude *in vitro* de la sensibilité des levures aux antifongiques.(Mayaların antifungallere olan duyarlılığının in vitro olarak incelenmesi.) Rev. Fr. Lab. **282**: 157-159.
5. KOENIG H., J. WALLER et M. KREMER. 1989. 8 yılda 70.000 izole mayanın tanısı ve epidemiyolojik özellikleri. Rev. Fr. Lab. **197**: 34-38.

Zmiany w stosunku do poprzedniej wersji są zaznaczone na szaro.

ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
☎: 33 (0)4 94 88 55 00
Faks: 33 (0)4 94 32 82 61
http://www.elitechgroup.com