

## CANDIFAST

Identification des levures et test de résistance aux antifongiques 30 tests

(Réf. 44030)

## CANDIFAST ES TWIN

Test de résistance des levures aux antifongiques 30 tests  
(Réf. 44130)



CPB 0038\_FR-2024-10

Pour diagnostic *in vitro* uniquement, pour usage professionnel seulement.

Test de diagnostic *in vitro* à usage unique

### 1 – INTERET

Le coffret CANDIFAST permet d'identifier les principales levures d'intérêt médical 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'hôte des conditions favorables. Ces conditions sont principalement les facteurs physiologiques (nouveau-nés, personnes âgées, femmes enceintes), les facteurs locaux (frottement, 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, onyx...), atteintes des muqueuses (muguet, oesophagites, 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 – PRINCIPE

L'identification de la levure est basée sur :

- la sensibilité ou non 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 ou au jaune-orangé de l'indicateur coloré dû 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 de l'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<br>#44030 | #44130 |
|---|--------------------|--------|
| CANDIFAST                               | 30                 | -      |
| CANDIFAST ES Twin                       | -                  | 15     |
| R1 : Flacon de Réactif 1                | 35                 | 35     |
| R2 : Flacon de Réactif 2                | 30                 | 30     |
| TC : Flacon de contrôle de la turbidité | 1                  | 1      |

Description :

CANDIFAST : Galerie 20 puits prête-à-l'emploi

Chaque galerie permet de tester un échantillon (identification + test de résistance)

### Série pour l'identification

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 (TRE) : tréhalose  
puits 5 (MAL) : maltose  
puits 6 (CEL) : cellobiose  
puits 7 (RAF) : raffinose  
puits 8 (LAC) : lactose  
Les puits 9 et 10 sont vides.

### Série pour le test de résistance

Le puits 1 est un puits de contrôle de croissance (C+)

Les puits 2 à 8 contiennent différents antifongiques :

puits 2 (AB) : amphotéricine B (4 µg/mL)  
puits 3 (NY) : nystatine (200 unités/mL)  
puits 4 (FCT) : flucytosine (35 µg/mL)  
puits 5 (ECZ) : éconazole (16 µg/mL)  
puits 6 (KTZ) : kétoconazole (16 µg/mL)  
puits 7 (MCZ) : miconazole (16 µg/mL)  
puits 8 (FCZ) : fluconazole (16 µg/mL)  
Les puits 9 et 10 sont vides.

CANDIFAST ES Twin : Galerie 2x10 puits prête à l'emploi.

Les deux séries de puits correspondent au test de résistance de la galerie CANDIFAST.

Chaque galerie permet de tester deux échantillons (tests de résistance uniquement)

R1 : Flacon de 4 mL de milieu semi-gélosé tamponné pour l'identification et la dilution.

Extrait de bœuf 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 bœuf 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 8,5 g/L, Rouge de phénol 0,052 g/L, Antibiotiques 1,16 g/L. pH 7,3 ± 0,1.

Contrôle de turbidité : Flacon de 4 mL de sulfate de baryum pour le contrôle de dilution.

### 5 – PRECAUTIONS

- Les réactifs de ce coffret sont destinés à usage *in vitro* uniquement et doivent être manipulés par des personnes habilitées.
- Les prélèvements et les réactifs ensemencés sont potentiellement 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 – RECUEIL 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
- Etuve à 37°C
- Réceptacle pour les déchets contaminés

### 9 – MODE OPERATOIRE

Amener les réactifs à températures ambiante (18-25°C) avant emploi.

#### 9.1 Préparation de l'inoculum

Prélever une colonie isolée à l'aide d'une cœse ou d'une pipette Pasteur bouchée. 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'aidant des traits noirs des étiquettes de flacon.

Si le Réactif 1 est plus clair (inoculum insuffisant), réensemencer 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 l'obtention d'une opacité correcte.

#### •A l'aide d'un densitomètre

Vérifier à l'aide d'un densitomètre que la turbidité du Réactif 1 ensemencé est égale à 1 Mac Farland. Si nécessaire opérer comme indiqué précédemment pour ajuster le trouble.

#### •Numération en cellule de Malassez

Il est possible de standardiser l'inoculum en effectuant une numération des levures en cellule de Malassez. On doit obtenir une solution de 2500 à 3500 levures par mm<sup>3</sup>.

#### 9.2a Inoculation de la galerie CANDIFAST

##### Série pour l'identification

Identifier la galerie. Soulever l'étiquette adhésive, puis distribuer dans chacun des 8 premiers puits :

- 100 µL de R1 ensemencé et standardisé
- 2 gouttes d'huile de paraffine.

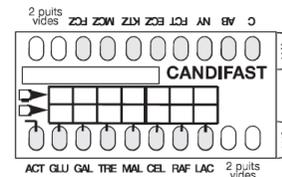
Recouvrir la série de puits avec l'étiquette adhésive.

##### Série pour le test de résistance

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 8 premiers puits :

- 100 µL de R2 préalablement ensemencé
- 2 gouttes d'huile de paraffine.

Recouvrir la série de puits avec l'étiquette adhésive.



#### 9.2b 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.

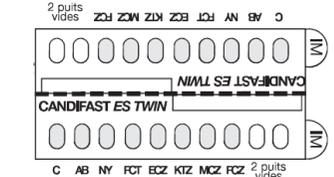
Bien identifier chacun des côtés de la galerie. Soulever l'étiquette adhésive puis distribuer dans chacun des 8 premiers puits de la première série :

- 100 µL de Réactif 2 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.



### 9.3 Incubation

Incuber la galerie à 37°C pendant 24 heures, si besoin et selon les souches poursuivre l'incubation jusqu'à 48 heures voire 72 heures.

Lire la galerie lorsque les levures ont poussé dans le puits contrôle.

### 10 – LECTURE ET INTERPRETRATION DE LA GALERIE

Ne lire l'ensemble de la galerie 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\* (\*pour les genres uréase positive)

#### 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

Un caractère négatif se traduit par une absence de virage au jaune ou au jaune-orangé ou au fuchsia.

##### Puits 2 à 8 (GLU à RAF)

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

Un caractère négatif se traduit par une absence de virage au jaune ou au jaune-orangé ou au fuchsia.

L'identification de la levure est réalisée à l'aide de la galerie et des caractères morphologiques des colonies.

Pour l'interprétation se reporter au tableau ci-dessous ou à la feuille incluse dans le coffret. Il est également possible de s'aider des indications inscrites sur l'adhésif de la galerie : lire le puits actidione (ACT) puis repérer le dernier puits positif à droite.

Le nom du germe est indiqué sur l'adhésif à l'intersection du caractère positif (rangée inférieure) ou négatif (rangée supérieure) de l'actidione et du sucre repéré.

| Levure  | 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   | +   | -   |
| Genres <i>Cryptococcus</i> ou <i>Trichosporon</i> ou <i>Rhodotorula</i> | V   |     |     |     |     |     |     |     |
| V. variable (+ ou -)  |     |     |     |     |     |     |     |     |

### Diagnostic différentiel

Les genres *Cryptococcus*, *Trichosporon* et *Rhodotorula* peuvent être différenciés par des caractères morphologiques.

- *Rhodotorula* donne des colonies de couleur rouge 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.

- *Trichosporon* présente un pseudomycélium sur milieu PCB.

### 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 globuleuses de grande taille.

*S. boulardii* sont des levures ovoïdes à allongées de plus petite taille.

• Avec la galerie CANDIFAST certaines souches *Cryptococcus* peuvent pousser en présence d'actidione.

### 10.2 Série pour le test de résistance

#### Puits 2 à 8 (AB à FCZ)

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 cupule.

### 11 – CONTROLE DE LA QUALITE

Afin de vérifier la standardisation de la méthode, il est recommandé de réaliser un contrôle de la qualité de façon périodique en utilisant les souches de références, *C. albicans* ATCC 90029 et *C. parapsilosis* ATCC 22019.

| Souche                                 | Incubation | Résultats attendus |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |     |     |     |     |     |
|--|------------|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  |            | ACT                | GLU | GAL | TRE | MAL | CEL | RAF | LAC | C+ | AB | NY | FCT | ECZ | KTZ | MCZ | FCZ |
| <i>C. albicans</i><br>(ATCC 90029)     | 24 heures  | +                  | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | +  | -  | -  | +   | -   | -   | -   | -   |
| <i>C. parapsilosis</i><br>(ATCC 22019) | 48 heures  | -                  | +   | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -  | -  | -  | -   | -   | -   | -   |     |

### 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 galerie en absence de virage de couleur dans le puits de contrôle de croissance.

• Lecture de la galerie 24 ou 48 heures après virage de couleur dans le puits de contrôle de croissance.

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 a 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 détecter la résistance des souches d'origine cutané-muqueuse, il n'est donc pas 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 poussent 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 TRE ne permet pas l'identification par la lecture du tableau. Tenir compte de la lecture de l'étiquette.

• Pour certaines souches de *C. glabrata* la difficulté de lecture du caractère GAL ne permet l'identification par le tableau. Tenir compte de la lecture de l'étiquette.

• 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

#### Etudes 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'étiquette, 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 galerie 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 galerie ATB Fungus de Biomérieux, est de 98,5%. Parmi les 10 discordances, 3 sont discordances majeures et 7 sont discordances mineures. Ces discordances concernent 4 souches (2 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* et 1 *C. tropicalis*) et 3 antifongiques dont l'éconazole (2 R/I et 1 R/S), le kétoconazole (1 R/I et 2 R/S) et le miconazole (4 R/I).

### 15 – ELIMINATION DES DECHETS

Les déchets doivent être éliminés en respectant les règles d'hygiène et la réglementation en vigueur pour ce type de réactif dans le pays d'utilisation.

### 16 – BIBLIOGRAPHIE

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.

Les modifications par rapport à la version précédente sont surlignées en gris.



#### ELITech MICROBIO

Parc d'activités du plateau  
19, allée d'Athènes  
83870 SIGNES  
FRANCE  
Tel : 33 (0)4 94 88 55 00  
<http://elitechgroup.com>