

# CANDIFAST

Identificazione dei lieviti e saggio di resistenza agli antimicotici

30 test (Rif. 44030)

# CANDIFAST ES TWIN

Saggio di resistenza dei lieviti agli antimicotici

30 test (Rif. 44130)

CPB 0038\_IT-2023-05

**1 – USO**  
Il kit CANDIFAST è indicato per l'identificazione dei principali lieviti coinvolti nelle patologie umane e per testare la loro resistenza a diversi antimicotici.

Il kit CANDIFAST ES TWIN serve ad analizzare la resistenza dei lieviti agli antimicotici.

## 2 – INTRODUZIONE

La frequenza delle infezioni fungine, e in particolare quelle causate da lieviti, è aumentata significativamente nel corso degli ultimi 10 anni (5). I lieviti sono agenti opportunisti. La maggior parte di essi è saprofita, ma può diventare patogena quando l'organismo ospite presenta dei fattori di predisposizione. Queste condizioni sono principalmente le seguenti: fattori fisiologici: neonati, anziani, donne in gravidanza; fattori locali: escoriazioni, macerazioni; fattori patologici: cancro, immunodeficienza, disturbi metabolici...; fattori correlati a terapie: antibiotici, pillola anticoncezionale, interventi chirurgici, farmaci immunosoppressivi, radiazioni ionizzanti... Le caratteristiche cliniche causate da questi lieviti sono piuttosto varie: effetti cutanei (intertrigine, onyxis...), disturbi muco-cutanei (candidosi orali, esofagiti, coliti, vaginiti...), infezioni viscerali e setticemie. L'aumento del numero degli agenti antimicotici disponibili, e l'apparire di micosi resistenti, giustifica un test sul comportamento dei lieviti in presenza di antimicotici (1,2).

**3 – PRINCIPIO**  
L'identificazione dei lieviti si basa sulle seguenti osservazioni:

- valutazione della resistenza del ceppo nei confronti dell'actidione mediante viraggio al giallo, o al giallo-arancio, o al fucsia dell'indicatore;
- fermentazione di sette zuccheri evidenziata dal viraggio al giallo o al giallo-arancio dell'indicatore, in seguito all'acidificazione del terreno;
- valutazione dell'attività ureasica mediante viraggio al fucsia dell'indicatore in seguito all'alcalinizzazione del terreno.

Il saggio di sensibilità dei lieviti nei confronti degli antimicotici è basato sulla crescita, o sull'assenza di crescita, dei lieviti stessi in presenza delle diverse molecole di antimicotici.

La crescita è visualizzata mediante un cambiamento di colore del terreno:

- la fermentazione del glucosio, ad opera dei lieviti, porta all'acidificazione del terreno (contente rosso fenolo) provocandone un viraggio al giallo o al giallo-arancio;
- l'idrolisi dell'urea, prodotta dai lieviti ureasi positivi, rilascia ammoniaca la quale, alcalinizzando il terreno (contenente rosso fenolo), non provoca un viraggio al rosa-fucsia.

## 4 – REAGENTI

Quantità	#44030	#44130
CANDIFAST	30	-
CANDIFAST ES Twin	-	15
R1 : Flacone di Reattivo 1	35	35
R2 : Flacone di Reattivo 2	30	30
TC : Flacone di Controllo della torbidità	1	1

**Descrizione**  
**CANDIFAST** : Galleria da 20 pozzetti pronta per l'uso.  
Ogni galleria permette di testare un campione (identificazione + test di resistenza)

**Serie per l'identificazione**  
Il pozzetto 1 contiene rosso fenolo, actidione (ACT) e glucosio (G) i pozzetti da 2 a 8 contengono rosso fenolo e ciascuno di essi i seguenti zuccheri :  
pozzetto 2 (GLU) : glucosio  
pozzetto 3 (GAL) : galattosio  
pozzetto 4 (TRE) : trealosio  
pozzetto 5 (MAL) : maltosio  
pozzetto 6 (CEL) : cellobiosio  
pozzetto 7 (RAF) : raffiniosio  
pozzetto 8 (LAC) : lattosio  
i pozzetti 9 e 10 sono vuoti

**CANDIFAST ES Twin** : Galleria da 2x10 pozzetti pronta per l'uso.  
Le due serie di pozzetti corrispondono al test di resistenza della galleria CANDIFAST.  
Ogni galleria consente di testare due campioni (unicamente test di resistenza).

**R1** : Fiale da 4 mL con peptone parzialmente agarizzato e tamponato per la diluizione e l'identificazione.  
Estratto di fue 1,3g/L, Peptone di caseina 1,8g/L, Estratto di lievito 0,8g/L, Aminoacidi, vitamine, minerali 5,75g/L, Urea 20g/L, Agar 0,52g/L, Antibiotici 1,12g/L, pH : 6,05 ± 0,1.  
**R2** : Fiale da 2 mL di YNB (Yeast Nitrogen Base) contenente urea e rosso fenolo per il test di resistenza.  
Estratto di fue 1,3g/L, Peptone di caseina 1,8g/L, Estratto di lievito 0,8g/L, Aminoacidi, vitamine, minerali 8,75g/L, Urea 20g/L, Glucosio 8,5g/L, Rosso fenolo 0,052g/L, Antibiotici 1,16g/L, pH : 7,3 ± 0,1.  
**CT** : Fiale da 4 mL con soluzione di solfato di bario per il controllo di diluizione.

## 5 – AVVERTENZE

- I reagenti presenti in questo kit sono destinati esclusivamente ad uso *in vitro* e devono essere maneggiati solo da personale abilitato.
- I ceppi e i reagenti inoculati sono potenzialmente infetti e devono pertanto essere maneggiati conformemente alle precauzioni d'uso, nel rispetto delle norme igieniche e delle normative in vigore nel paese di utilizzo di questo tipo di prodotto.
- I reagenti contenenti materie prime di origine animale devono essere maneggiati nel rispetto delle precauzioni d'uso.
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.
- Non utilizzare i reagenti danneggiati o conservati scorrettamente prima dell'uso.

## 6 – PRELIEVO DEL CAMPIONE

Le colonie da utilizzare per l'esecuzione del test d'identificazione e di resistenza devono essere:  
- isolate da non più di 24-48 ore;  
- perfettamente isolate a temperatura ambiente o a 37°C su terreno agarizzato, preferibilmente in piastra di Petri. Si raccomandache l'isolamento sia fatto su terreni specifici per i lieviti (3).

## 7 – CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti conservati a 2 - 8°C al di sotto del loro stato originale sono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. La semi-galleria CANDIFAST ES Twin non utilizzata può essere conservata per 7 giorni a 2-8°C nel suo imballaggio originale ermeticamente chiuso e con la bustina disidratante

## 8 – REAGENTI MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Olio di paraffina
- Pipette sterili
- Incubatore impostato a 37°C
- Contenitore per rifiuti contaminati

## 9 – PROCEDURA

Lasciar stabilizzare i reagenti a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso.

### 9.1 Preparazione dell'inoculo

Prelevare una colonia isolata con un'ansa o con una pipetta Pasteur e stemperarla in un flacone di Reagente 1. Per mescolare bene, agitare leggermente il flacone.

La standardizzazione dell'inoculo può essere effettuata in tre modi differenti:

- In relazione al flacone TC di Controllo della torbidità

Regolare la torbidità del Reagente 1 inoculato, con quella del flacone TC con l'aiuto delle linee nere stampate sull'etichetta del flacone. Se il Reagente 1 è più chiaro (inoculo insufficiente) inoculare ulteriormente il flacone finché la torbidità ottenuta sia uguale a quella del flacone di controllo della torbidità. Se il Reagente 1 è più scuro (inoculo troppo ricco) diluire il flacone con dell'altro Reagente 1 fino ad ottenere un'opacità corretta.

- Con un densitometro

Verificare con un densitometro che la torbidità del Reagente 1 inoculato sia corrispondente a 1 McFarland. Se necessario procedere come sopra per aggiustare la torbidità.

- Numerazione con Cellula di Malassez

La standardizzazione dell'inoculo può essere effettuata contando i lieviti con una cellula di Malassez. Si deve ottenere una soluzione da 2500 a 3500 lieviti per mm<sup>3</sup>.

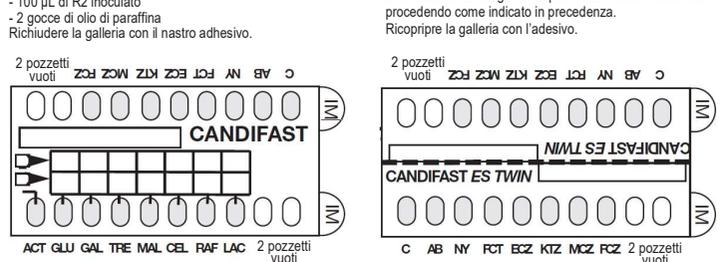
### 9.2a Inoculo della Galleria CANDIFAST

**Serie di pozzetti per l'identificazione**

Marchare la galleria per identificare il campione da analizzare.  
Sollevare il nastro adesivo e distribuire in ognuno dei primi 8 pozzetti:  
- 100 µL di R1 inoculato e standardizzato  
- 2 gocce di olio di paraffina  
Richiudere la galleria con il nastro adesivo.

### Serie di pozzetti per il test di resistenza

Inoculare il Reagente 2 con 100 µL di Reagente 1 inoculato e standardizzato (vedi paragrafo 9.1). Sollevare il nastro adesivo e distribuire in ognuno dei primi 8 pozzetti:  
- 100 µL di R2 inoculato  
- 2 gocce di olio di paraffina  
Richiudere la galleria con il nastro adesivo.



**9.3 Incubazione**  
Incubare la galleria a 37°C per 24 ore. Se necessario, e a seconda dei ceppi, l'incubazione può essere protratta fino a 48 o anche 72 ore.

## 10 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DELLA GALLERIA

Leggere ciascuna galleria nella sua completezza solo se il pozzetto di controllo (C+; pozzetto 1 della serie per il test di resistenza) presenta i seguenti viraggi:

- Viraggio al giallo, o al giallo-arancio, o al fucsia\* (\*per il genere ureasi positivo)

### 10.1 Serie di pozzetti per l'identificazione

**Pozzetto 1 (ACT)**  
Il carattere è positivo quando si osserva un cambiamento di colore:  
- **Cambiamento di colore al giallo, o al giallo-arancio, o al fucsia**  
Un carattere è **negativo** quando non si osserva alcun viraggio al giallo, o al giallo-arancio, o al fucsia.

**Pozzetti da 2 a 8 (oie GLU a RAF)**  
Un carattere è positivo quando si osserva un cambiamento di colore del terreno:  
- **Cambiamento di colore al giallo, o al giallo-arancio, o al fucsia**  
Un carattere è **negativo** quando non si osserva alcun viraggio al giallo o al giallo-arancio, o al fucsia.

L'identificazione dei lieviti è eseguita con la galleria CANDIFAST e con la contemporanea osservazione delle caratteristiche morfologiche delle colonie.  
Per l'interpretazione, riferirsi alla tabella sotto riportata o all'inserito fornito nel kit. Può anche essere utilizzata la legenda posta sul nastro adesivo di ogni galleria: leggere per primo il pozzetto dell'actidione; poi localizzare l'ultimo pozzetto positivo, alla vostra destra. Il nome del microorganismo è stampato sulla pellicola adesiva all'intersezione dell'actidione-positivo (fila inferiore) o actidione-negativo (fila superiore) con lo zucchero corrispondente all'ultimo pozzetto positivo.

Lieviti	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	+	-
<i>Cryptococcus</i> o <i>Trichosporon</i> o <i>Genere Rhodotulura</i>	v	-	-	-	-	-	-	-

ureasi positivi

## Diagnosi differenziale

*Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Rhodotulura* spp. potrebbero essere differenziati mediante osservazione morfologica.  
- *Rhodotulura* spp. dà origine a caratteristiche colonie rosso-arancio quando crescono su Sabouraud Dextrose Agar.  
- Alcuni ceppi di *Cryptococcus* spp. Potrebbero anche produrre una pigmentazione rossastra, perciò *Cryptococcus* spp. dovrebbe essere esaminato per la presenza di una capsula mediante India ink.  
- *Trichosporon* spp. Produce pseudofite che si sviluppano in PCB Agar Medium.

## Note

- Tra le specie di *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae* è il principale patogeno umano.
- Ceppi di *Saccharomyces boulardii* o di *Saccharomyces cerevisiae* possono essere isolati da pazienti sotto trattamento con lievito secco.
- L'osservazione microscopica può differenziare le due specie :
  - *S. cerevisiae* produce cellule di lievito grandi
  - *S. boulardii* costituisce cellule più piccole, a forma d'uovo o allungate.

• Con CANDIFAST alcuni ceppi di *Cryptococcus* spp. potrebbero crescere in presenza di actidione, alla concentrazione testata.  
**10.2 Serie di pozzetti per il test di resistenza**  
**Pozzetti da 2 a 8 (da AB a FCZ)**

Un cambiamento di colore del terreno al giallo o al giallo-arancio, o al fucsia, indica che il ceppo saggiato è in grado di crescere in quel pozzetto e di conseguenza è resistente all'antimicotico di quel pozzetto.  
Per contro, se il colore del pozzetto rimane arancio-rosso, la crescita del ceppo saggiato è stata inibita dall'antimicotico presente in quel pozzetto.

## 11 – CONTROLLO DI QUALITÀ

Per verificare la standardizzazione del metodo, si raccomanda di realizzare periodicamente un controllo qualità usando i ceppi di riferimento, *Candida albicans* ATCC 90029 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Cepco	Incubazione	Risultati attesi															
		ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC	C+	AB	NY	FCT	ECZ	KTZ	MCZ	FCZ
<i>C. albicans</i> (ATCC 90029)	24 ore	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	48 ore	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

## 12 – CAUSE DI ERRORE

- Preparazione di un inoculo troppo ricco o troppo fragile.
  - Preparazione dell'inoculo a partire da un mélange di coltura o con colonie isolate da oltre 48 ore.
  - Lettura della galleria in assenza di viraggio di colore nel pozzetto di controllo di crescita.
  - Lettura della galleria 24 o 48 ore dopo il viraggio di colore nel pozzetto di controllo di crescita.
- In generale, il mancato rispetto delle raccomandazioni delle presenti istruzioni.

## 13 – LIMITAZIONI

- Questo metodo *in vitro* per la determinazione della resistenza agli antimicotici ha valore indicativo nei riguardi dell'interazione antimicotico-lieviti durante il trattamento *in vivo* (2,4).
- La procedura CANDIFAST si applica ai ceppi di lieviti di origine muco-cutanea per la loro identificazione e per il saggio di sensibilità agli antimicotici; non è dunque indicata per ceppi di lieviti provenienti da micosi sistemiche.
- La procedura CANDIFAST non permette una categorizzazione in Sensibile-Intermedio-Resistente.
- Alcuni ceppi termotensibili isolati a 20°C, crescono in modo diverso a 37°C. Nel caso in cui i lieviti non dovessero crescere, o dovessero crescere con difficoltà, l'identificazione e la resistenza ad alcuni antimicotici non potrà essere determinata.
- Per alcuni ceppi di C. lusitanae un ritardo di crescita nel pozzetto TRE non consente l'identificazione attraverso la lettura della tabella. Tener conto della lettura dell'etichetta.
- Per alcuni ceppi di C. glabrata la difficoltà di lettura del carattere GAL non permette l'identificazione con la tabella. Tener conto della lettura dell'etichetta.
- L'interpretazione della lettura dei test di resistenza non deve tener conto dell'aspetto torbido, poiché dopo l'incubazione per gli antimicotici azolati può apparire un velo.

## 14 – PRESTAZIONI

**Studio su ceppi di raccolta.**  
Lo studio è stato realizzato su 80 ceppi di raccolta (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* e 1 *Trichosporon cutaneum*). 78 ceppi sono stati correttamente identificati con la lettura tramite l'etichetta, pari al 97,5% di concordanza rispetto al metodo FUNGICHROM di ELITech MICROBIO o API 32C di Biomérieux.  
La concordanza globale del test di resistenza, rispetto al FUNGITEST di Biorad e alla galleria ATB Fungus di Biomérieux, è dell'87,4%.

### Studio su ceppi clinici

Lo studio è stato realizzato su 100 ceppi isolati di recente provenienti da prelievi clinici effettuati in un ospedale cittadino (72 *Candida albicans*, 9 *C. glabrata*, 8 *C. parapsilosis*, 5 *C. tropicalis*, 3 *C. krusei*, 1 *C. kefyr*, 1 *C. inconspicua* e 1 *Saccharomyces* spp). 98 ceppi sono stati correttamente identificati rispetto al sistema VITEK di Biomérieux.  
La concordanza globale del test di resistenza, rispetto al FUNGITEST di Biorad e alla galleria ATB Fungus di Biomérieux, è del 98,5%. Tra le 10 discordanze, 3 sono discordanze maggiori e 7 sono discordanze minori. Queste discordanze riguardano 4 ceppi (2 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* e 1 *C. tropicalis*) e 3 antimicotici tra cui l'ecozonolo (2 R/I e 1 R/S), il chetoconazolo (1 R/I e 2 R/S) e il miconazolo (4 R/I).

## 15 – SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

I rifiuti devono essere smaltiti rispettando le regole di igiene e la regolamentazione vigente per questo tipo di prodotto nel paese in cui viene utilizzato.

## 16 – BIBLIOGRAFIA

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. KAUMAG 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 è un marchio registrato da ELITech MICROBIO  
I cambiamenti rispetto alla versione precedente sono evidenziate in grigio.

**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