



CPB 0038_IT-2024-10

Solo per uso diagnostico in vitro, solo per uso professionale.

Test diagnostico in vitro monouso

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 saprofiti, 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, disordini 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...), disordini 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), ne provoca un viraggio al rosa-fucsia.

4 – REAGENTI

Confezionamento :

Reattivo

	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

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

Serie per il saggio di sensibilità

Il pozzetto 1 è il pozzetto di controllo della crescita (C+)

I pozzetti da 2 a 8 contengono e ciascuno un diverso antimicotico, come di seguito:
 pozzetto 2 (AB) : amfotericina B (4 µg/mL)
 pozzetto 3 (NY) : nistatina (200 unità/mL)
 pozzetto 4 (FCT) : flucitosina (35 µg/mL)
 pozzetto 5 (ECZ) : econazolo (16 µg/mL)
 pozzetto 6 (KTZ) : ketoconazolo (16 µg/mL)
 pozzetto 7 (MCZ) : miconazolo (16 µg/mL)
 pozzetto 8 (FCZ) : fluconazolo (16 µg/mL)
 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 terreno parzialmente agarizzato e tamponato per la diluizione e l'identificazione.

Estratto di bue 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 bue 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 de 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 raccomanda che 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 temperarla 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 mm3.

9.2a Inoculo della Galleria CANDIFAST

Serie di pozzetti per l'identificazione

Marcare 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

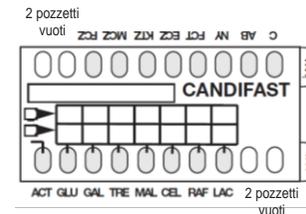
Richiudere la galleria con il nastro adesivo.

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 distribuiré in ognuno dei primi 8 pozzetti:

- 100 µL di R2 inoculato
- 2 gocce di olio di paraffina

Richiudere la galleria con il nastro adesivo.



9.2b Inoculo della Galleria CANDIFAST ES Twin

Serie per un primo campione

Inoculare il reagente R2 con 100 µL di reagente R1 inseminato e standardizzato.

Identificare bene ognuno dei lati della galleria.

Sollevare l'adesivo e distribuire in ognuno dei primi 8 pozzetti della prima serie:

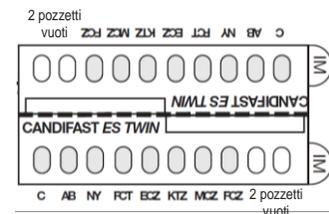
- 100 µL di reagente 2 preliminarmente inseminato

- 2 gocce di olio di paraffina

Serie per un secondo campione

Inseminare allo stesso modo la seconda serie usando un altro flacone di reagente 2 preliminarmente inseminato procedendo come indicato in precedenza.

Ricoprire la galleria con l'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 (da 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 microrganismo 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 Genere <i>Rhodotorula</i>	V							

ureasi positivi

V : variabile (+ o -)

Diagnosi differenziale

Cryptococcus, *Trichosporon* e *Rhodotorula spp.* potrebbero essere differenziati mediante osservazione morfologica.

- *Rhodotorula 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 pseudoife 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.

Ceppo	Incubazione	Risultati attesi																
		ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC	C+	AB	NY	FC	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 termosensibili 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'econazolo (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 – BIBLIOGRAPHIE

1. DUPONT B. 1987. Résistance de Candide 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.

I cambiamenti rispetto alla versione precedente sono evidenziate in grigio.



ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau

19 allée d'Athènes 83870

SIGNES

FRANCE

☎ : 33 (0)4 94 88 55 00

<http://www.elitechgroup.com>