

CANDIFAST

Identificatie van gisten en antischimmelresistentietest

30 tests (Cat. 44030)

CANDIFAST ES TWIN

Antischimmelresistentietest voor gisten

30 tests (Cat. 44130)

CPB 0038 NL-2024-10
Alleen voor diagnostisch gebruik in vitro, alleen voor professioneel gebruik.
In-vitro-diagnostest voor eenmalig gebruik.



1 - BEOOGD GEBRUIK
De CANDIFAST-kit maakt de identificatie van de belangrijkste menselijke pathogene gisten mogelijk, evenals het testen van hun resistentie tegen verschillende antischimmelmiddelen.
De CANDIFAST ES *Twin*-kit is bedoeld voor het testen van de weerstand van gisten tegen verschillende antischimmelmiddelen.

2 - INLEIDING
Schimmelinfecties en vooral die veroorzaakt door gisten zijn de afgelopen tien jaar aanzienlijk toegenomen (5). Gisten zijn opportunistische middelen. De meeste van hen zijn saprophyten, maar ze kunnen pathogeen worden wanneer de omstandigheden in de gastheer gunstig worden. Deze aandoeningen zijn voornamelijk de fysiologische factoren (pasgeboren baby's, ouderen, zwangere vrouwen), de lokale factoren (schaafwonden, maceraties), de pathologische factoren (kanker, immuundeficiëntie, stofwisselingsstoornissen...), de therapiegerelateerde factoren (antibiotica, anticonceptiepillen, immunosuppressiva, ioniserende straling, chirurgie...).De klinische kenmerken veroorzaakt door deze gisten zijn vrij gevarieerd: huidaandoeningen (intertrigo, onyxis...), mucocutane aandoeningen (orale candidiasis, oesofagitis, colitis, vaginitis...) viscerale en septicemische aandoeningen.
De toename van het aantal beschikbare antischimmelmiddelen en het verschijnen van behandelingsresistente mycosen rechtvaardigen het testen van de respons van de gisten in aanwezigheid van antischimmelmiddelen (1, 2).

3 - PRINCIPE
De identificatie van de gist is gebaseerd op:

- de gevoeligheid van de geteste stam voor actidion, die wordt gevisualiseerd door een kleurverandering van de indicator naar geel, oranjegeel of fuchsia;
- de fermentatie van zeven suikers die wordt gevisualiseerd door een kleurverandering van de indicator naar geel of naar oranjegeel als gevolg van de verzuring van het medium,
- de demonstratie van urease-activiteit, die een alkalinisatie van het medium veroorzaakt, waardoor de indicator verandert in een fuchsia-kleur.
De bepaling van de weerstand van gisten tegen antischimmelmiddelen is gebaseerd op de groei of de afwezigheid van groei van deze gisten in aanwezigheid van verschillende antischimmelmiddelen. Groei wordt gedemonstreerd door een kleurverandering van het medium:
- de fermentatie van glucose door de gisten leidt tot verzuring van het fenolrood bevattende medium, waardoor het verandert in een gele of een oranjegele kleur,
- bij de hydrolyse van ureum door de urease-positieve gisten komt ammoniak vrij die het fenolrood bevattende medium alkaliniseert, waardoor het verandert in een fuchsia-rose kleur.

4 - REAGENTIA		
Verpakking		
Reagens	Aantal	
	#44030	#44130
CANDIFAST	30	-
CANDIFAST ES <i>Twin</i>	-	15
R1 : flacon met reagens 1	35	35
R2 : flacon met reagens 2	30	30
TC : flacon met troebelheidscontrole	1	1

Beschrijving
CANDIFAST : bak met 20 putjes, klaar voor gebruik
Elke bak maakt het testen van één monster mogelijk (identificatie + weerstandstest)

Rij voor identificatie	Rij voor weerstandstest
Putje 1 bevat fenolrood, actidion (ACT) en glucose. Putje 2 tot 8 bevatten als volgt fenolrood en een andere suiker: putje 2 (GLU): glucose putje 3 (GAL): galactose putje 4 (TRE): trehalose putje 5 (MAL): maltose putje 6 (cel): cellobiose putje 7 (RAF): raffinose putje 8 (Lac): lactose putjes 9 en 10 zijn leeg	Putje 1 is een groeicontroleput (C+) Putjes 2 tot 8 bevatten als volgt een ander antischimmelmiddel: putje 2 (AB): amfotericine B (4 µg/ml) putje 3 (NY): nystatine (200 eenheden/ml) putje 4 (FCT): flucytosine (35 µg/ml) putje 5 (ECZ): econazol (16 µg/ml) putje 6 (KTZ): ketoconazol (16 µg/ml) putje 7 (MCZ): miconazol (16 µg/ml) putje 8 (FCZ): fluconazol (16 µg/ml) putjes 9 en 10 zijn leeg

CANDIFAST ES *Twin*: bak met 2x10 putjes, klaar voor gebruik
De twee rijen putjes zijn identiek aan de weerstandstestrij van de CANDIFAST-bak. Elke bak maakt het testen van twee monsters mogelijk (alleen weerstandstests).

R1: flacon van 4 ml met gebufferd agarmedium voor verdunning en identificatie. Rundvleesextract 1.3g/l, Caseïnepepton 1.8g/l, Gistextract 0.8g/l, Amino-zuren, vitaminen, mineralen 5,75g/l, Ureum 20 g/l, Agar 0,52g/l, Antibiotica 1,12g/l. pH: 6,05 ± 0,1.
R2: flacon van 2 ml met YNB (giststikstofbasis) medium dat ureum en fenolrood bevat voor weerstandstest. Rundvleesextract 1.3g/l, Caseïnepepton 1.8g/l, Gistextract 0.8g/l, Amino-zuren, vitaminen, mineralen 8,75g/l, Ureum 20g/l, Glucose 8.5g/l, Fenolrood 0.052g/l, Antibiotica 1,16g/l. pH: 7,3 ± 0,1.
TC: flacon van 4 ml met bariumsulfaatoplossing.

5 - VOORZORGSMAATREGELEN
• De reagentia zijn uitsluitend bedoeld voor *in vitro* gebruik en moeten door geautoriseerd personeel worden gehanteerd.
• De monsters en geïnoculeerde reagentia zijn mogelijk besmettelijk; ze moeten met voorzichtigheid worden gehanteerd, met inachtneming van de hygiënevoorschriften en de huidige voorschriften voor dit type product in het land van gebruik.
• Reagentia die grondstoffen van dierlijke oorsprong bevatten, moeten voorzichtig worden gehanteerd.
• Gebruik reagentia niet meer na de vervaldatum.
• Gebruik geen reagentia die vóór het gebruik beschadigd of slecht geconserveerd zijn.

6 - VERZAMELING VAN MONSTERS
De kolonies die worden gebruikt voor het uitvoeren van de identificatie en de weerstandstest moeten jong zijn (24 tot 48 uur oud) en perfect geïsoleerd bij kamertemperatuur of bij 37 °C op een agarmedium, bij voorkeur in een petrischaal. Het wordt aanbevolen om te isoleren op media die specifiek zijn voor gist (3).

7 - REAGENSVOORRAAD
De kit en de inhoud ervan wanneer deze bij 2-8 °C in hun oorspronkelijke staat wordt bewaard, zijn stabiel tot de op de doos vermelde uiterste gebruiksdatum. De helft van een CANDIFAST ES *Twin* kan gedurende 7 dagen worden bewaard bij 2 tot 8 °C, in de originele verpakking, opnieuw verzegeld met het droogmiddel.

8 - REAGENS EN MATERIALEN VEREIST MAAR NIET GELEVERD
• Paraffineolie
• Incubator bij 37°C
• Steriele pipet
• Container voor verontreinigd afval

9 – PROCEDURE
Laat de reagentia vóór gebruik op kamertemperatuur komen (18-25°C).

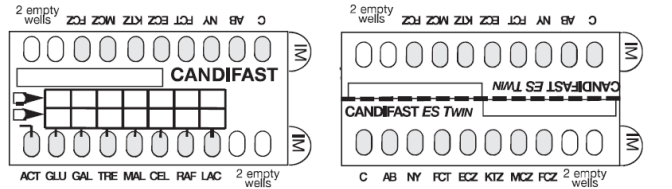
9.1. Bereiding van het entmateriaal
Pak een geïsoleerde kolonie op met een entoog of een geoccludeerde Pasteur-pipet. Beënt een flacon met reagens 1 met de kolonie. Meng dit goed. De

standaardisatie van het entmateriaal kan op drie verschillende manieren worden uitgevoerd:

- **Met betrekking tot de troebelheidscontroleflacon**
Pas de opaciteit van het beënte reagens 1 aan op die van de troebelheidscontrole met behulp van de zwarte lijnen die op de flaconetiketten zijn afgedrukt. Als reagens 1 lichter is (onvoldoende entmateriaal), beënt u de flacon verder totdat de verkregen opaciteit gelijk is aan die van de flacon met troebelheidscontrole. Als reagens 1 troebeler is (entmateriaal te rijk), verdun het dan met reagens 1 uit een andere vers geopende flacon totdat de juiste troebelheid is verkregen.
- **Met een Densitometer**
Controleer met een densitometer of de troebelheid van het beënte reagens 1 gelijk is aan 1 Mac Farland. Ga indien nodig verder zoals hierboven om de troebelheid aan te passen.
- **Opsomming in Malassez-cel**
Het is mogelijk om het entmateriaal te standaardiseren door de gisten in een Malassez-cel te tellen. Er moet een oplossing van 2.500 tot 3.500 gisten per mm3 worden verkregen.

9.2a Beënting van CANDIFAST-bak
Identificatiereg
Markeer de testbak om het te testen monster te identificeren. Til de zelfklevende tape op en doseer als volgt in elk van de eerste 8 putjes:
- 100 µl geïnoculeerd gestandaardiseerd R1
- 2 druppels paraffineolie
Sluit de testbak opnieuw af met zelfklevende tape.
Weerstandstestrij
Beënt eerst reagens 2 met 100 µl geïnoculeerd gestandaardiseerd reagens 1 (zie § 9.1). Til vervolgens de zelfklevende tape op en doseer als volgt in elk van de eerste 8 putjes:
- 100 µl geïnoculeerd R2
- 2 druppels paraffineolie.
Sluit de testbak opnieuw af met het zelfklevende tape.

9.2.b Inoculatie van CANDIFAST ES *Twin*-bak
Eerste monsterrij
Beënt reagens R2 met 100 µl geïnoculeerd gestandaardiseerd reagens R1. Label beide rijen van de bak. Til de zelfklevende tape op en doseer in elk van de eerste 8 putjes:
- 100 µl geïnoculeerd reagens 2
- 2 druppels paraffineolie.
Sluit de testbak opnieuw af met zelfklevende tape.
Tweede monsterrij
Beënt op dezelfde manier de tweede rij met een extra flacon met geïnoculeerd reagens 2 zoals hierboven beschreven. Sluit de testbak opnieuw af met zelfklevende tape.



9.3. Incubatie
Incubeer de testbak gedurende 24 uur bij 37°C; indien nodig en afhankelijk van de stammen, kan deze incubatie tot 48 of zelfs 72 uur worden verlengd. De bak wordt afgelezen zodra de gist goed in de controle is gegroeid.

10 - AFLEZING EN INTERPRETATIE
Lees elke testbak in zijn geheel alleen als er in de controleput (C+: putje 1 van de weerstandstestrij) de volgende kleurverandering van het medium is:
- **Kleurverandering naar geel, naar oranjegeel of naar fuchsia* (*voor urease-positieve geslachten)**

10.1 Identificatiereg
Putje 1 (ACT)
Het kenmerk is positief wanneer een kleurverandering van het medium wordt waargenomen:
- **Kleurverandering naar geel, naar oranjegeel of naar fuchsia**
Een kenmerk is negatief wanneer er geen kleurverandering is naar geel, naar oranjegeel of naar fuchsia.
Putjes 2 tot 8 (GLU naar RAF)
Een kenmerk is positief wanneer een kleurverandering van het medium wordt waargenomen:

- Kleurverandering naar geel, naar oranjegeel of naar fuchsia

Een kenmerk is negatief wanneer er geen kleurverandering is naar geel, naar oranjegeel of naar fuchsia.

De identificatie van de gisten wordt uitgevoerd met de CANDIFAST-bak parallel aan de analyse van de morfologische kenmerken van de kolonies.

Raadpleeg voor interpretatie de onderstaande tabel of de tabel in de kit. De markeringen op de zelfklevende tape van de testbak kunnen ook worden gebruikt: **lees eerst de actidion goed af; zoek vervolgens het laatste positieve putje, aan de rechterkant ervan.** De naam van de kiem wordt op de zelfklevende tape afgedrukt op de kruising van het actidion-positieve (onderste rij) of actidion-negatieve (bovenste rij) kenmerk en de gevonden suiker.

Yeast	ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	V	+	-	-	-
<i>Candida albicans</i> (var stellatoidea)	+	+	-	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> or <i>Trichosporon</i> or <i>Rhodotorula</i> genera v: variabel (+/-/-)	V			positive urease				

Differentiële diagnose

- Cryptococcus*-, *Trichosporon*- en *Rhodotulora*-soorten kunnen worden onderscheiden door morfologisch onderzoek.
- *Rhodotulora*-soorten worden gekenmerkt door kenmerkende oranje-rode kolonies wanneer ze worden gekweekt op Sabouraud's dextrose-agar.
- Sommige stammen van *Cryptococcus*-soorten kunnen ook een roodachtige pigmentatie produceren. Daarom moeten *Cryptococcus*-soorten worden onderzocht op de aanwezigheid van een capsule door een India-inktpreparaat.
- *Trichosporon*-soorten produceren pseudohyfen wanneer ze worden gekweekt op PCB-agarmedium.

Opmerking

- Van de *Saccharomyces*-soorten is *Saccharomyces cerevisiae* de belangrijkste menselijke pathogene soort.
- Stammen van *Saccharomyces boulardii* of *Saccharomyces cerevisiae* kunnen worden geïsoleerd van patiënten die een behandeling ondergaan op basis van gist.
- Een microscopisch onderzoek kan de twee soorten onderscheiden:
 - *S. cerevisiae* zijn grote bolvormige gisten.
 - *S. boulardii* zijn kleiner van formaat, eivormig of langwerpig.
- Met de CANDIFAST-test kunnen sommige stammen van *Cryptococcus* groeien in aanwezigheid van actidion.

10.2 Weerstandstestrij

Putjes 2 tot 8 (AB naar FCZ)

Een kleurverandering van het medium naar geel, naar oranjegeel of naar fuchsia geeft aan dat de geteste soort daar goed kan groeien en dus resistent is tegen de aanwezige antischimmelmiddelen.

Als de put oranje-rood blijft, is de groei van de geteste soort geremd door de schimmelwerende middelen in die put.

11 - KWALITEITSCONTROLE

Het wordt aanbevolen om de standaardisatie van de methode van tijd tot tijd te controleren met behulp van de referentiestammen, *Candida albicans* ATCC 90029 en *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Stam	Incubatie	Verwachte resultaten															
		ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC	C+	AB	NY	FCT	ECZ	KTZ	MCZ	FCZ
<i>C. albicans</i> (ATCC 90029)	24 uur	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	48 uur	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

12- OORZAKEN VAN FOUTEN

- Bereiding van een entmateriaal dat te geconcentreerd of niet geconcentreerd genoeg is.

- Bereiding van het entmateriaal uit een gemengde cultuur of met geïsoleerde kolonies die langer dan 48 uur zijn gekweekt.
- Bak afgelezen vóór het verschijnen van een kleurverandering van de groei-indicator.
- Bak niet afgelezen na incubatie gedurende 24 of 48 uur, ook al was de groei-indicator positief.
- In het algemeen, het niet naleven van de aanbevelingen in de instructies.

13 - BEPERKINGEN

- Deze *in vitro* methode voor het bepalen van de weerstand tegen antischimmelmiddelen heeft een indicatieve waarde voor de antischimmel-gist interactie tijdens *in vivo* behandeling (2,4).
- De CANDIFAST-procedure is alleen bedoeld voor de identificatie en het testen van de weerstand tegen antischimmelmiddelen van gisten van mucocutane oorsprong. Het mag daarom niet worden gebruikt voor giststammen van systemische mycosen.
- De CANDIFAST-procedure staat geen categorisering in Gevaarlijk-Intermediair-Resistent toe.
- Sommige thermosensitieve stammen geïsoleerd bij 20 °C groeien anders bij 37 °C. In dit geval zullen de gisten niet groeien of ze zullen slecht groeien. Als gevolg hiervan zou het erg moeilijk, zo niet onmogelijk, zijn om een betrouwbare stamidentificatie uit te voeren of om hun resistentie tegen bepaalde antischimmelmiddelen te beoordelen.
- Voor bepaalde stammen van *C. lusitanae* maakt een vertraging van de groei in de Tre-bron identificatie met de bijgevoegde tabel moeilijk te bereiken. Identificatie kan ook worden bereikt door te verwijzen naar de markeringen op de zelfklevende tape van de testbak.
- Voor bepaalde stammen van *C. glabrata* maakt het moeilijk om de GAL-karakteristiek af te lezen, identificatie met de bijgevoegde tabel moeilijk te bereiken. Identificatie kan ook worden bereikt door te verwijzen naar de markeringen op de zelfklevende tape van de testbak.
- Bij de interpretatie van de weerstandstests wordt geen rekening gehouden met vertroebeling van het medium die kan optreden na incubatie met azool-antischimmelmiddelen.

14 - PRESTATIEKENMERKEN

Verzamelstammen

Het onderzoek is uitgevoerd met 80 verzamelstammen (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* en 1 *Trichosporon cutaneum*). 78 stammen werden correct geïdentificeerd met behulp van de markeringen op de zelfklevende tape van de testbak en gaven een overeenstemming van 97,5% met de ELITech MICROBIO FUNGICHROM-methode en de Biomérieux API 32C-methode. De algemene overeenkomst voor de weerstandstest in vergelijking met de Biorad FUNGITEST en de Biomérieux ATB Fungus-bak, was 87,4%.

Klinische stammen

Het onderzoek is uitgevoerd op 100 vers geïsoleerde stammen van klinische monsters die zijn genomen van patiënten in gemeenschapsgesondheidspraktijken (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 stammen werden correct geïdentificeerd in vergelijking met de BIOMÉRIEUX Vitek-methode. De algemene overeenkomst voor de weerstandstest in vergelijking met de Biorad FUNGITEST en de Biomérieux ATB Fungus-bak, was 98,5%. Van de 10 discrepanties zijn er 3 grote fouten en 7 kleine fouten. Deze discrepanties betreffen 4 stammen (2 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* en 1 *C. tropicalis*) en 3 antischimmelmiddelen: econazol (2 R/I en 1 R/S), ketoconazol (1 R/I en 2 R/S) en miconazol (4 R/I).

15 - AFVALVERWIJDERING

Afval dient te worden afgevoerd in overeenstemming met de hygiënevoorschriften en de huidige voorschriften voor dit soort producten in het land van gebruik.

16 – BIBLIOGRAFIE

1. DUPONT B. 1987. Résistance de Candida aux antifongiques. Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Hoofdstuk 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.

De wijzigingen ten opzichte van de vorige versie zijn grijs gemarkeerd



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>