

CANDIFAST

Identificação de leveduras e teste de resistência aos antifúngicos 8 testes 30 testes (Ref. 44030)

CANDIFAST ES TWIN

Teste de resistência das leveduras aos antifúngicos 30 testes

CPB 0038_PT-2024-10

Somente para uso diagnóstico in vitro, só para uso

Os testes são apenas para uso único

CE

1 – UTILIZAÇÃO PREVISTA

O kit CANDIFAST permite identificar as principais leveduras patogênicas para ser humano, e testar a respectiva resistência a diversos agentes antifúngicos. O kit CANDIFAST ES TWIN permite testar a resistência das leveduras a diversos antifúngicos.

2 - INTRODUCAO

Nos últimos dez anos, verificou-se um aumento considerável da frequência das infecções fúngicas e, mais especificamente, das infecções causadas por leveduras(5). As leveduras são agentes oportunistas. A maior parte são saprófitas, mas transformam-se em agentes patogênicos, se o hospedeiro apresentar condições favoráveis. Estas condições são, essencialmente as seguintes: factores fisiológicos: recém-nascidos, idosos, grávidas; factores locais: abrasões, macerações; factores patológicos: cancro, imunodeficiência, perturbações metabólicas...; factores iatrogénicos: antibioterapia, anticoncepcionais, imunossupressores, radiações ionizantes, cirurgias...Os quadros clínicos provocados pelas leveduras são extremamente variados: doenças cutâneas (intertrigo, oníxia...), doenças das mucocutâneas (candidíase oral, esofagites, colites, vaginites...), infecções viscerais e septicemia. O aumento do número dos agentes antifúngicos disponíveis bem como o surgimento de micoses resistentes aos tratamentos justificam a avaliação da resposta das leveduras aos ant-fúngicos (1, 2).

3 - PRINCIPIO

A identificação da levedura baseia-se:

- na sensibilidade ou não da estirpe à actidiona visualizada pela passagem do indicador corante a amarelo, amarelo- alaranjado ou a fuchsia,
- na fermentação de sete açúcares visualizada pela passagem do indicador para amarelo ou amarelo alaranjado, devido à acidificação do meio,
- na demonstração da actividade urease, que alcaliniza o meio e faz passar o indicador corante para fuchsia.

A determinação da resistência das leveduras aos ant-fúngicos baseia-se no crescimento ou da sua ausência, das leveduras na presença de diferentes antifúngicos. Este crescimento visualiza-se através de uma alteração da cor do meio:

- a fermentação da glicose pelas leveduras conduz a uma acidificação do meio, com o vermelho de fenol presente que se torna amarelo ou amarelo-alaranjado.
- a hidrólise da ureia pelas leveduras urease-positivas liberta amónia que alcaliniza o meio e o vermelho de fenol do meio altera-se para rosa fuchsia

4 – REGEANTES

Acondicionamento		Quantidade	
Reagente		#44030	#44130
CANDIFAST		30	-
CANDIFAST ES Twin		-	15
R1 : Frasco de Reagente 1		35	35
R2 : Frasco de Reagente 2		30	30
TC : Frasco de controlo da turvação		1	1

Descrição

Galeria CANDIFAST: Galeria de 20 poços, pronta a utilizar. Cada galeria permite testar uma amostra (identificação + teste de resistência)

Série para a identificação

O poço 1 contém acidiona (ACT), glicose e vermelho de fenol.
Os poços 2 a 8 contêm diferentes açúcares e vermelho de fenol
poço 2: (GLU) glicose
poço 3: (GAL) galactose
poço 4: (TRE) trealose
poço 5: (MAL) maltose
poço 6: (CEL) celobiose
poço 7: (RAF) rafinose
poço 8: (LAC) Lactose
Os poços 9 e 10 estão vazios

Série para o teste de resistência

O poço 1 consiste num poço de controlo de crescimento (C+)
Os poços 2 a 8 diferentes anti-fungicos:
poço 2 (AB): anfotericina B (4 µg/mL)
poço 3 (NY): nistatina (200 unidades/mL)
poço 4 (FCT): flucitosina (35 µg/mL)
poço 5 (ECZ): econazol (16 µg/mL)
poço 6 (KTZ): cetoconazol (16 µg/mL)
poço 7 (MCZ): miconazol (16 µg/mL)
poço 8 (FCZ): fluconazol (16 µg/mL)
Os poços 9 e 10 estão vazios

CANDIFAST ES Twin: Galeria de 2x10 poços, pronta a utilizar. As duas séries de poços são idênticas à série do teste de resistência da galeria CANDIFAST. Cada galeria permite testar duas amostras (apenas testes de resistência)
R1: Frasco de 4 mL de meio agar tamponado para a diluição e a identificação. Extracto de bovino 1,3 g/L, Peptona de caseína 1,8 g/L, Extracto de levedura 0,8 g/L, Aminoácidos, vitaminas, minerais 5,75 g/L, Ureia 20 g/L, Agar 0,52 g/L, Antibióticos 1,12 g/L. pH: 6,05 + 0,1.
R2: Frasco de 2 mL com meio YNB (base azotada para leveduras) com ureia e vermelho de fenol. Extracto de bovino 1,3 g/L, Peptona de caseína 1,8 g/L, Extracto de levedura 0,8 g/L, Aminoácidos, vitaminas, minerais 8,75 g/L, Ureia 20 g/L, Glicose 8,5 g/L, Vermelho de fenol 0,052 g/L, Antibióticos 1,16 g/L. pH: 7,3 +0,1.
TC: Frasco de 4 mL de sulfato de bário para o controlo da diluição.

5 - PRECAUÇÕES

- Os reagentes desta embalagem foram concebidos apenas para utilização in vitro, só devendo ser manipulados por técnicos especializados.
- As amostras e os reagentes inoculados são potencialmente infeciosos; logo, devem ser manipulados de acordo com as precauções de utilização implementadas, respeitando as normas em termos de higiene bem como a legislação em vigor no país de utilização para este tipo de produto.
- Os reagentes que contêm matérias-primas de origem animal devem ser manipulados de acordo com as precauções de utilização.
- Não utilize os reagentes que estejam fora do prazo de validade.
- Não utilize os reagentes danificados ou indevidamente conservados antes do respectivo uso.

6 - COLHEITA DAS AMOSTRAS

As colónias utilizadas para a identificação da levedura e para o teste de resistência devem ser recentes (com 24 horas a 48 horas) e perfeitamente isoladas à temperatura ambiente ou a 37 °C num meio de agar, numa placa de Petri. É aconselhável que se proceda ao isolamento em meios específicos para leveduras (3).

7 - CONSERVAÇÃO DOS REAGENTES

Os reagentes conservados a 2-8 °C no estado original permanecem estáveis até ao fim do prazo de validade indicado na embalagem. A metade da galeria CANDIFAST ES Twin não utilizada, pode ser conservada durante 7 dias à temperatura de 2-8°C, na embalagem de origem resselada e com o dessecante.

8 - REAGENTE E MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDOS

- Óleo de parafina
- Pipetas estéreis
- Estufa a 37 °C
- Recipiente para resíduos contaminados

9 - MODO DE FUNCIONAMENTO

Estabilize os reagentes à temperatura ambiente (18-25 °C) antes da sua utilização.

9.1. Preparação do inóculo

Com a ajuda de uma ansa ou de uma pipeta Pasteur com a extremidade fundida, proceda à colheita de uma colónia isolada. De seguida, inocule num frasco de

reagente. Misture bem.
A padronização do inóculo pode ser efectuada de diferentes maneiras:
• **Relativamente ao frasco CT de controlo da turvação**
Ajuste a opacidade do Reagente 1 inoculado de acordo com a do frasco CT, com a ajuda das linhas pretas na etiqueta do frasco.
Caso o Reagente 1 seja mais claro (inóculo insuficiente), proceda à re-inoculação do frasco até obter uma opacidade igual à do frasco CT.
Se o Reagente 1 se apresentar mais turvo (inóculo demasiado rico), proceda à sua diluição com um frasco de Reagente 1 aberto de novo, até conseguir uma opacidade correcta.
• **Com a ajuda de um densitómetro**
Com a ajuda de um densitometro, certifique-se de que a turvação do Reagente 1 inoculado corresponde a **1 Mac Farland**. Caso se mostre necessário, proceda conforme previamente indicado de modo a ajustar a turvação.
• **Numeração em célula Malassez**
É possível padronizar o inóculo procedendo a uma contagem das leveduras em células de Malassez. Deve obter-se uma solução de 2500 a 3500 leveduras por mm³.

9.2a. Inoculação da galeria CANDIFAST

Série de identificação
Identifique devidamente a galeria em relação à amostra testada. Retire o revestimento adesivo e, distribua em cada um dos 8 primeiros poços:
- 100 µL de R1 inoculado e padronizado
- 2 gotas de óleo de parafina.
Volte a tapar a série de poços com o revestimento adesivo.

Série para o teste de resistência
Primeiro, proceda à inoculação do Reagente 2 com 100 µL de Reagente 1 inoculado e padronizado (ver § 9.1). Depois, retire o revestimento adesivo e distribua em cada um dos 8 primeiros poços:
- 100 µL de R2 previamente inoculado
- 2 gotas de óleo de parafina.
Volte a tapar a série de poços com o revestimento adesivo.

9.2b. Inoculação da galeria CANDIFAST ES Twin

Série para primeira amostra
Inocule o reagente R2 com 100 µL de reagente R1 inoculado e padronizado. Identifique devidamente cada uma das filas da galeria. Retire o revestimento adesivo e, de seguida, distribua em cada um dos 8 primeiros poços:
- 100 µL de Reagente 2 previamente inoculado
- 2 gotas de óleo de parafina.
Volte a tapar a galeria com o revestimento adesivo.

Série para a segunda amostra
Inocule a segunda série segundo o mesmo processo com a ajuda de um outro frasco de Reagente 2 previamente inoculado. Volte a tapar a galeria com o revestimento adesivo.

9.3. Incubação
Incube a galeria a 37 °C durante 24 horas se necessário e, consoante o tipo de estirpes, prossiga com a incubação até 48 horas ou, inclusivamente, 72 horas. Leia a galeria quando as leveduras tiverem crescido no poço controlo.

10 - LEITURA E INTERPRETAÇÃO
Leia toda a galeria, apenas se observar, no poço controlo (C+: Poço 1 da série para teste de resistência), a seguinte mudança de cor do meio:
- passagem a amarelo ou a amarelo-alaranjado ou ao fuchsia* (*para os géneros urease-positivos)
10.1 Série para a identificação
Poço 1 (ACT)
A reacção é positiva quando, no poço ACT, se observar uma mudança da cor do meio:
- **Passagem ao amarelo ou ao amarelo-alaranjado ou ao fuchsia**
Uma reacção negativa traduz-se por uma inexistência de passagem ao amarelo ou ao amarelo-alaranjado ou ao fuchsia.
Poço 2 a 8 (GLU a RAF)

A característica é positiva quando, num desses poços, se observa uma mudança de cor do meio:

- **Passagem ao amarelo ou a amarelo-alaranjado ou a fuchsia**

Uma característica é negativa quando não há passagem a amarelo ou a amarelo-alaranjado ou a fuchsia.

A identificação da levedura é efectuada com a galeria CANDIFAST e com a análise em paralelo das características morfológicas das colónias.

Para a interpretação, consulte a tabela seguinte ou o quadro em anexo na embalagem. É igualmente possível consultar as marcações inscritas no revestimento adesivo da galeria: **leia primeiro o poço de actidiona (ACT) e, de seguida, localize o último poço positivo à direita.** O nome do microrganismo vem indicado no revestimento adesivo, na intersecção da reacção positiva (fileira inferior) ou negativa (fileira superior) da actidiona e do açúcar localizado.

Levedura	ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	V	+	-	-	-
<i>Candida albicans</i> (var <i>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	+	-
Géneros <i>Cryptococcus</i> ou <i>Trichosporon</i> ou <i>Rhodotorula</i>	V							
V: variável (+ ou -)								

Diagnóstico diferencial

Os géneros *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Rhodotorula* podem ser diferenciados por exame morfológico.

-As espécies *Rhodotorula* caracterizam-se por colónias distintas de cor vermelho-salmão cultivadas em meio Sabouraud.

-Algumas espécies de *Cryptococcus* também produzem uma coloração avermelhada. Devem ser examinadas na presença de uma cápsula com uma preparação de tinta da china.

- *Trichosporon* forma pseudohifas em meio agar PCB.

Nota

•No género *Saccharomyces*, a *Saccharomyces cerevisiae* é a principal espécie patogénica para o ser humano.

• É possível isolar estirpes de *Saccharomyces boulardii* ou de *Saccharomyces cerevisiae* de doentes com tratamento à base de leveduras.

• Um exame ao microscópio permite diferenciar as duas espécies:

- *S. cerevisiae* são leveduras esféricas de grandes dimensões.
- *S. boulardii* são leveduras ovóides a alongadas de dimensões mais reduzidas.

• Com a galeria CANDIFAST, determinadas estirpes *Cryptococcus* podem crescer na presença de ctidiona.

10.2 Série para o teste de resistência

Poço 2 a 8 (AB a FCZ)

Uma mudança de cor do meio para amarelo ou amarelo-alaranjado ou fuchsia, traduz a capacidade da estirpe testada para se desenvolver nesse poço, na concentração testada do antifúngico, à qual é resistente. Pelo contrário, a cor vermelho-alaranjada do meio indica que a estirpe foi inibida pelo antifúngico presente no poço

11 - CONTROLO DE QUALIDADE

Para verificar a padronização do método, recomenda-se a realização de um controlo de qualidade, periodicamente, com estirpes de Referência, *Candida albicans* ATCC 90029 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Estirpe	Incubação	Resultados esperados											
		ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC	C+	AB	N	FCT
<i>C. albicans</i> (ATCC 90029)	24 horas	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	48 horas	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-

12 - CAUSAS DE ERROS

- Preparação de um inóculo demasiado rico ou demasiado fraco.
- Preparação do inóculo a partir de uma mistura de culturas ou com colónias isoladas com mais de 48 horas de crescimento.
- Leitura da galeria na ausência de mudança da cor no poço de controlo de crescimento.

• Leitura da galeria 24 ou 48 horas após a mudança da cor no poço de controlo de crescimento.

E, de um modo geral, a inobservância das recomendações incluídas no presente folheto informativo.

13 - LIMITAÇÕES

• Este método de determinação in vitro da resistência aos anti-fúngicos possui um valor indicativo acerca da interacção do par antifúngico-levedura, nos tratamentos in vivo (2,4).

• O método CANDIFAST ou CANDIFAST ES *Twin* foi desenvolvido com o propósito de identificar e detectar a resistência aos antifúngicos, apenas em estirpes de origem mucocutânea; não é, pois, recomendado para estirpes isoladas de micoses sistémicas.

• O método CANDIFAST não permite uma categorização em Sensível-Intermédio-Resistente

• Algumas estirpes termossensíveis isoladas a 20 °C crescem de modo diferente a 37 °C; Neste caso, as leveduras não crescem ou crescem mal, e tanto a identificação como a demonstração da resistência a determinados antifúngicos, em termos de fiabilidade, serão muito difíceis, se não mesmo impossíveis.

• No caso de determinadas estirpes de *C. lusitanae*, um atraso do crescimento no poço TRE torna difícil a identificação através da leitura da tabela. A leitura da etiqueta torna possível a identificação.

• No caso de determinadas estirpes de *C. glabrata*, a dificuldade de leitura da reacção GAL torna difícil a identificação através da leitura da tabela. A leitura da etiqueta torna possível a identificação.

• A interpretação da leitura dos testes de resistência não deve tomar em consideração a turvação do meio, que pode surgir após a incubação com antifúngicos azóis.

14 - DESEMPENHO

Estudo com estirpes de colheita

O estudo foi efectuado com 80 estirpes de colheita (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* 1 *Trichosporon cutaneum*). 78 estirpes foram identificadas correctamente através da leitura com a ajuda da etiqueta, com 97,5% de concordância relativamente ao método FUNGICHROM da ELITech MICROBIO ou API 32C da Biomérieux.

A concordância global do teste de resistência, em comparação com o FUNGITEST da Biorad e com a galeria ATB Fungus da Biomérieux, foi de 87,4%.

Estirpes clínicas

O estudo foi efectuado com 100 estirpes recentemente isoladas provenientes de amostras clínicas colhidas em consultório médico (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.*).

Foram correctamente identificadas 98 estirpes, em comparação com o sistema VITEK da Biomérieux.

A concordância global do teste de resistência, em comparação com o FUNGITEST da Biorad e com a galeria ATB Fungus da Biomérieux, é de 98,5%. Entre as 10 discordâncias, 3 são erros maiores e 7 são erros menores. Estas discordâncias dizem respeito a 4 estirpes (2 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* e 1 *C. tropicalis*) e a 3 anti-fúngicos: econazol (2 R/I e 1 R/S), o cetoconazol (1 R/I e 2 R/S) e o miconazol (4 R/I).

15 - ELIMINAÇÃO DOS RESÍDUOS

Os resíduos têm de ser eliminados, respeitando as normas de higiene bem como a legislação em vigor para este tipo de reagentes no país de utilização.

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. 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.

As alterações em relação à versão anterior são destacadas em cinzento.



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