

CANDIFAST

Identificarea levurilor și test de determinare a sensibilității la antifungice

30 de teste (Cod 44030)

CANDIFAST ES TWIN

Test pentru determinarea rezistenței levurilor la antifungice

30 de teste (Cod 44130)

CPB 0038 RO-2024-10

Numai pentru diagnostic in vitro, numai pentru uz profesional.

Test de diagnostic in vitro de unică folosință

CE

1 - RECOMANDĂRI GENERALE

CANDIFAST a fost conceput pentru identificarea principalelor levuri de interes medical și testarea rezistenței acestora la diferite substanțe antifungice. Pachetul CANDIFAST ES *TWIN* a fost conceput pentru testarea sensibilității levurilor la diferite antifungice.

2 - INTRODUCERE

Frecvența infecțiilor cauzate de levuri a crescut semnificativ în ultimii zece ani (5). Levurile sunt agenți oportuniști. Majoritatea dintre ele sunt saprofite, dar pot deveni patogene când organismul gazdă oferă condiții favorabile. Aceste condiții sunt în principal factori fiziologici (nou născuți, persoane în vârstă, sarcină), factori locali (ulcerați, macerații), factori patologici (cancer, imunodeficiență, disfuncții metabolice), factori ce țin de terapii (antibiotice, anticoncepționale, medicamente imunosupresive, radiații ionizante, intervenții chirurgicale). Modificările clinice cauzate de levuri sunt variate: efecte cutanate (intertigo, onyxis), disfuncții mucocutanate (candidoză orală, esofagită, colită, vaginită), afecțiuni viscerale și septicemii.

Creșterea numărului de antifungice accesibile și apariția micozelor rezistente la tratament justifică testarea comportamentului levurilor în prezența antifungicelor (1, 2).

3 - PRINCIPIU

Identificarea levurilor se bazează pe următoarele observații:

- sensibilitatea tulpinii la actidionă, care se indicată prin schimbarea culorii indicatorului în galben, galben-portocaliu sau roșu,
- studiul de fermentare a șapte tipuri de glucide, detectată prin schimbarea culorii indicatorului în galben sau galben-portocaliu datorită acidificări mediului
- demonstrarea activității ureazice, care cauzează alcalinizarea mediului, schimbând culoarea indicatorului în roșu.

Determinarea sensibilității levurilor la antifungice se bazează pe creșterea sau inhibiția creșterii acestora în prezența diferitelor substanțe antifungice. Creșterea este demonstrată prin schimbarea culorii mediului:

- fermentarea glucozei datorită levurilor acidifică mediul, ceea ce determină virajul de roșu fenol din mediu în galben sau galben- portocaliu.
- hidroliza ureei prin eliberarea amoniacului de către levurile ureazo-pozitive alcalinizează mediul, ceea ce determină virajul de roșu fenol din mediu în roz.

4 - REACTIVI

Conditionare:		
Reactiv	Cantitate	
	#44030	#44130
CANDIFAST	30	-
CANDIFAST ES <i>Twin</i>	-	15
R1 : Flacon de reactiv 1	35	35
R2 : Flacon de reactiv 2	30	30
TC : Flacon de control de turbiditate	1	1

Descriere:

CANDIFAST: Galerie cu 20 de godeuri deja pregătite
Fiecare galerie permite testarea unui eșantion (identificare + test de rezistență)

Rândul de identificare:

Godeul 1 conține roșu fenol, actidionidă (ACT) și glucoză.
Godeurile 2-8 conțin roșu fenol și câte un zahăr
godeul 2 (GLU): glucoză
godeul 3 (GAL): galactoză
godeul 4 (TRE): trehaloză
godeul 5 (MAL): maltoză
godeul 6 (CEL): celobioză
godeul 7 (RAF): rafinoză
godeul 8 (LAC): lactoză
Godeurile 9 și 10 sunt goale.

CANDIFAST ES *Twin*: Galerie 2x10 godeurile deja pregătite
Cele două rânduri de godeuri corespund testului de rezistență din galeria CANDIFAST. Fiecare galerie permite testarea a două eșantioane (numai teste de rezistență)

R1: Flacon de 4 mL de mediu semi-geloză tamponată pentru identificare și diluare.
Extract de bou 1,3 g/L, Peptonă de caseină 1,8 g/L, Extract de levură 0,8 g/L, Aminoacizi, vitamine, minerale 5,75 g/L, Uree 20 g/L, Agar 0,52 g/L, Antibiotice 1,12 g/L. pH: 6,05 ± 0,1.
R2: Flacon de 2 mL mediu lichid pentru testul de rezistență.
Extract de bou 1,3 g/L, Peptonă de caseină 1,8 g/L, Extract de levură 0,8 g/L, Aminoacizi, vitamine, minerale 5,75 g/L, Uree 20g/L, Glucoză 8,5g/L, Roșu de fenol 0,052 g/L, Antibiotice 1,16 g/L. pH: 7,3 ± 0,1.
TC: Flacon de 4 mL de sulfat de bariu pentru controlul diluției.

5 - PRECAUTII

- Reactivii sunt numai pentru diagnostic in vitro și trebuie utilizați de personal autorizat.
- Probele colectate și reactivii însămânțați reprezintă o potențială sursă de infecție și vor fi manipulați cu precauție, respectând regulile de igienă și reglementările naționale în vigoare pentru acest tip de produs.
- Reactivii conțin materii prime de origine animală și trebuie manipulați cu atenție.
- Nu utilizați reactivii după termenul de expirare.
- Nu utilizați reactivii care sunt deteriorați sau care au fost depozitați în mod necorespunzător înainte de utilizare.

6 - RECOLTAREA PROBELOR

Coloniile prelevate pentru identificarea și testarea sensibilității trebuie să fie:
- tinere (24-48 ore)
- să fie izolate la temperatura camerei sau la 37 °C pe mediu solid, de preferabil în cutii Petri. Se recomandă ca mediul să fie specific pentru levuri. (3).

7 - PĂSTRAREA REACTIVILOR

Reactivii păstrați la 2-8°C sunt stabili în starea originală până la data menționată pe cutie.
Semi-galeria CANDIFST ES *Twin* neutilizată poate fi păstrată 7 zile la 2-8°C în ambalajul original închis ermetic împreună cu agentul de deshidratare.

8 - REACTIVI ȘI MATERIALE NECESARE DAR NEINCLUSE ÎN KIT

- Ulei de parafină
- Pipete sterile
- Incubator la 37°C
- Container pentru deșeuri contaminate

9 - METODA DE LUCRU

Aduceți reactivii la temperatura camerei (18-25°C) înainte de utilizare.

9.1. Prepararea inocului

Prelevați o colonie izolată cu o ansă sau cu o pipetă Pasteur. În continuare, însămânțați colonia într-un flacon cu Reactiv 1. Se amestecă cât mai bine. Standardizarea inocului se poate efectua pe trei căi:
• În raport cu flaconul TC de control de turbiditate
Ajustați opacitatea Reactivului 1 deja însămânțat în funcție de flaconul TC consultând liniile negre tipărite pe eticheta flaconului TC.
Dacă Reactivul 1 este mai deschis la culoare decât (inocul insuficient), reînsămânțați flaconul până se obține o opacitate egală cu cea a flaconului TC.
Dacă Reactivul 1 este prea tulbure (inocul prea bogat), diluați cu un nou flacon de

Rândul pentru testarea rezistenței:

Godeul 1 este un godeu de control al creșterii.
Godeurile 2-8 contin antifungice diferite:
godeul 2 (AB): amfotericină B (4 µg/mL)
godeul 3 (NY): nistatină (200 unități/mL)
godeul 4 (FCT): flucitozină (35 µg/mL)
godeul 5 (ECZ): econazol (16 µg/mL)
godeul 6 (KTZ): ketoconazol (16 µg/mL)
godeul 7 (MCZ): miconazol (16 µg/mL)
godeul 8 (FCZ): fluconazol (16 µg/mL)
Godeurile 9 și 10 sunt goale.

Reactiv 1 până ce obțineți opacitatea corectă.

• Cu ajutorul Densitometrului

Verificați cu un densitometru dacă turbiditatea Reactivului 1 inoculat este egală cu 1 MacFarland. Dacă este necesar, ajustați turbiditatea conform proceduri descrise.

• Enumerare într-o Celulă Malassez

Standardizarea inocului este posibilă prin numărarea levurilor într-o celulă Malassez. Trebuie obținută o soluție de 2 500-3500 levuri/mm³.

9.2a. Inocularea în galerie CANDIFAST

Serie pentru identificare

Marcați testul pentru a putea fi identificat.
Ridicați folia protectoare și dispensați în fiecare din primele 8 godeuri:
-100 µL din Reactivul 2 inoculat și standardizat
- 2 picături de ulei de parafină.
Acoperiți godeurile cu folia protectoare.
Serie pentru testul de rezistență
În primul rând, inoculați Reactivul 2 cu 100 µL din Reactivul 1 inoculat
și standardizat (conf. §9.1). În al doilea rând, Ridicați folia protectoare și dispensați în fiecare din primele 8 godeuri:
- 100 µl din R2 inoculat în prealabil
- 2 picături de ulei de parafină.
Acoperiți seria de godeuri cu eticheta adezivă.

9.2b. Inocularea în galerie CANDIFAST ES *Twin*

Serie pentru primul eșantion

Inoculați reactivul R2 cu 100 µL de reactiv R1 inoculat și standardizat. Identificați bine fiecare parte a galeriei.
Ridicați folia protectoare și dispensați în fiecare din primele 8 godeuri din prima serie:
- 100 µl din Reactivul 2 inoculat în prealabil
- 2 picături de ulei de parafină.
Acoperiți seria de godeuri cu eticheta adezivă.
Serie pentru al doilea eșantion
Inoculați în același mod cea de-a doua serie cu ajutorul unui alt flacon de Reactiv 2 inoculat în prealabil, conform metodei de mai sus.
Acoperiți seria de godeuri cu eticheta adezivă.

9.3. Incubație

Incubați galeria la 37°C timp de 24 de ore, dacă este cazul și, în funcție de tulpini prelungiți perioada de incubație până la 48 sau chiar 72 de ore.
Citiți galeria după ce levurile au pătruns în godeurile de control.

10 - CITIREA ȘI INTERPRETAREA GALERIEI

Nu citiți întreaga galerie decât dacă în godeul de control (C+: Godeuri 1 din seria de test de rezistență) se observă o schimbare a culorii mediului:

- viraj la galben sau galben-portocaliu sau roșu* (* pentru genurile de urează pozitivă)

10.1 Serie pentru identificare

Godeuri 1 (ACT)

Caracterul este **pozitiv** dacă într-unul din aceste godeuri se observă o schimbare de culoare a mediului:

- Viraj la galben sau galben-portocaliu sau purpurii

Caracterul **negativ** se traduce prin lipsa virajului de culoare la galben sau galben-portocaliu sau purpurii.

Godeuri 2+8 (GLU à RAF)

Caracterul este **pozitiv** dacă într-unul din aceste godeuri se observă o schimbare de culoare a mediului:

- Viraj la galben sau galben-portocaliu sau purpurii

Caracterul **negativ** se traduce prin lipsa virajului de culoare la galben sau galben-portocaliu sau purpurii.

Levura se identifică cu ajutorul galeriei și a caracterelor morfologice ale coloniilor.

În vederea interpretării trebuie să ne raportăm la tabelul de mai jos sau la fișa inclusă în pachet, ne mai putem folosi în egală măsură de indicațiile menționate de folia adezivă a galeriei: **citiți godeurile actidione (ACT), după care reparați ultimul godeu pozitiv din partea dreaptă.** Numele germenului este menționat

pe folia adezivă la intersectarea caracterului pozitiv (rândul inferior) sau negativ (rândul superior) al actidionei și aminoacizilor depistați.

Levură	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	+	-
Genurile <i>Cryptococcus</i> sau <i>Trichosporon</i> sau <i>Rhodotorula</i>	V							
V : variabilă (+ sau -)								

Diagnostic diferențial

Genurile *Cryptococcus*, *Trichosporon* sau *Rhodotorula* pot fi diferențiate prin caractere morfologice.

- *Rhodotulrola* produce colonii de culoare roșie somon cu caracteristici puternice pe geloza Sabouraud.

- *Cryptococcus* are o capsulă polizaharidică evidențiată de colorație de cerneală de China diluată la 1/5. Il pe geloză Sabouraud dă colonii de culoare roșie somon de intensitate mai mică decât coloniile de *Rhodotulrola*.

- *Trichosporon* prezintă un pseudomicellium pe mediu PCB.

Observații

- În cadrul speciei *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae* este principala specie patogenă întâlnită la om.
- Tulpinile de *Saccharomyces boulardii* sau *Saccharomyces cerevisiae* pot fi izolate de pacient prin tratament pe bază de levuri.
- Analiza la microscop permite o diferențiere între cele două specii:
 - *S. cerevisiae* sunt levuri globuloase de talie mare.
 - *S. boulardii* sunt levuri ovoidale cu prelungiri de talie mai mică.

• În cazul galeriei CANDIFAST, anumite tulpini *Cryptococcus* pot crește în prezența actidionei.

10.2 Seria pentru testul de rezistență

Godeurile 2-8 (AB-FCZ)

O schimbare de culoare a mediului în galben sau galben portocaliu sau roșu denotă capacitatea tulpinii testate de a se dezvolta în medii cu concentrația antifungică testată. În acest caz, tulpina a dobândit rezistență. În caz contrar, dacă mediul devine roșu portocaliu, tulpina a fost inhibată de concentrația de antifungic din recipient.

11 - CONTROL DE CALITATE

Pentru a verifica standardizarea metodei, se recomandă realizarea unui control periodic al calității folosind tulpăine de referință, *C. albicans* ATCC 90029 și *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Tulpină	Incubație	Rezultate scontate													
		ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC	C+	AB	NY	FCT	ECZ	KTZ
<i>C. albicans</i> (ATCC 90029)	24 de ore	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	48 de ore	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

12 - CAUZE DE EROARE

- Prepararea unui inocul prea bogat sau prea slab.
 - Prepararea unui inocul pomind de la un amestec de cultură sau cu colonii izolate pe perioade mai mari de 48 de ore.
 - Citirea galeriei în lipsa unui viraj de culoare în godeurile de control de creștere.
 - Citirea galeriei la 24 sau 48 de ore după virajul de culoare în godeurile de control de creștere.
- Și, în general, nerespectarea recomandărilor din prezentul aviz.

13 - LIMITELE METODEL

- Această metodă de determinare *in vitro* a rezistenței la antifungice are valoare orientativă cu privire la interacțiunea cuplului antifungice-levuri în urma tratamentelor *in vivo* (2, 4).
- Metoda CANDIFAST a fost dezvoltată pentru identificarea și detectarea rezistenței tulpinilor de origine cutaneo-mucoasă și, în consecință, nu este recomandată pentru tulpinile izolate de micoze sistemice.
- Metoda CANDIFAST nu permite o categorisire pe criteriile Sensibil -

Intermediar - Rezistent.

- Tulpinile termosensibile izolate la 20°C cresc diferit la 37°C; în acest caz, fie levurile nu vor crește, fie nu vor crește bine iar identificarea precum și evidențierea rezistenței la anumite antifungice nu vor putea fi realizate.
- Pentru anumite tulpini de *C. lusitanae*, o întârziere de creștere în godeurile TRE nu permite identificarea prin citirea tabelului. Țineți cont de indicațiile de pe etichetă.
- Pentru anumite tulpini de *C. glabrata*, dificultatea de citire a caracterului GAL nu permite identificarea cu ajutorul tabelului. Țineți Cont de indicațiile de pe etichetă.
- Interpretarea rezultatelor testelor de rezistență nu trebuie să țină cont de tulburare, un strat care se poate crea după incubație în cazul antifungicelor izolate.

14 - PERFORMANTE

Studii pe tulpini de colectie

Studiul a fost realizat pe 80 de tulpini de colecție (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* și 1 *Trichosporon cutaneum*.) 78 de tulpini au fost identificate corect prin citirea cu ajutorul etichetei, fie 97,5% de concordanță în raport cu metoda FUNGICHROM a ELITech MICROBIO sau API 32C a Biomerieux.

Concordanța globală a testului de rezistență, în comparație cu FUNGITEST de Biorad și cu galeria ATB Fungus de Biomerieux este de 87,4%.

Studii pe tulpinile clinice

Studiul a fost realizat pe 100 de tulpini izolate de curând, provenind din probe clinice (72 *Candida albicans*, 9 *C. glabrata*, 8 *C. parapsilosis*, 5 *C. tropicalis*, 3 *C. krusei*, 1 *C. kefyr*, 1 *C. inconspicua* și 1 *Saccharomyces spp.*) 98 de tulpini au fost identificate corect în raport cu sistemul VITEK al Biomerieux. Concordanța globală a testului de rezistență, în comparație cu FUNGITEST al Biorad și cu galeria ATB Fungus a Biomerieux este de 98,5%. Printre cele 10 discrepante, 3 sunt discrepante majore și 7 sunt discrepante minore. Aceste discrepante se aplică în cazul a 4 tulpini (2 *C. glabrata*, 1 *C. parapsilosis* și 1 *C. tropicalis*) și 3 antifungice printre care enumerăm econazol (2 R/I și 1 R/S), ketonazol (1 R/I și 2 R/S) și miconazol (4R/I).

15 - ELIMINAREA DESEURILOR

Deșeurile trebuie eliminate în conformitate cu regulile de igienă și reglementările naționale în vigoare referitoare la acest tip de reactivi.

16 – BIBLIOGRAFIE

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.

Modificările de la versiunea anterioară sunt evidențiate în gri.



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>