

CANDIFAST

Identifikacija gljivica i test osetljivosti na antimikotike

30 testova (Kataloski broj 44030)

CANDIFAST ES TWIN

Test osetljivosti gljivica na antimikotike

30 testova (Kataloski broj 44130)

CPB 0038- SR-2024-10

Samo za *in vitro* dijagnostiku, isključivo za profesionalnu uporabu

Testovi su samo za jednokratnu uporabu.



1- UPOTREBA
Candifast omogućava identifikaciju glavnih humanih patogenih gljivica kao i njihovu osetljivost na različite antimikotične agense.
Candifast *ES Twin* je namenjen za testiranje osetljivosti gljivica na različite antimikotične agense.

2 - UVOD
Gljivične infekcije posebno one izazvane gljivicama su u neprekidnom porastu u poslednjih deset godina (5). Gljivice su oportunisti. Vecina njih su saprofiti, ali oni mogu postati patogeni u uslovima koji to favorizuju. Ti uslovi su najčešće fiziološki faktori (novorodjenčad, stari, trudnice), lokalni faktori (povrede, izloženost vlazi), patološki faktori (kanceri, imuno-deficijencije, metabolički poremećaji...), faktori vezani za terapiju (antibiotici, kontraceptivi, imunosupresivi, jonizujuće zračenje, hiruški zahvati...). Klinički znaci izazvani ovim gljivicama prilično variraju: oboljenja kože (npr inpertrigo ...), oboljenja sluzokože (oralna kandidijaza, ezofagitis, kolitis, vaginitis ...) visceralna oboljenja i septikemije.
Povećanje broja raspoloživih antimikotika i pojava mikoza rezistentnih na terapiju antimikotcima čine opravdanim testiranje ponašanja gljivica u prisustvu antimikotika.

3 – PRINCIP
Identifikacija gljivica se bazira na:

- Osetljivosti testiranog soja na aktidion što se primećuje kao promena boje indikatora ili u žutu ili narandžasto žutu ili u fuscin crveno.
- Fermentaciji sedam šećera što se primećuje kao promena boje indikatora u žutu ili narandžasto žutu tokom acidifikacije medijuma.
- Demonstracija ureazne aktivnosti, što produkuje alkalizaciju medijuma, rezultujući promenom boje indikatora u fuscin crveno.

Odredjivanje rezistentnosti gljivica na antimikotike bazira se na rastu ili odsustvu rasta ovih gljivica u prisustvu različitih antimikotika. Rast se iskazuje promenom boje medijuma: koji sadrži fenol crveno, dovodeći do promene u žutu ili narandžasto žutu boju.

- Fermentacija glukoze od strane gljivica vodi acidifikaciji medijuma
- Hidroliza ureje od strane ureaza pozitivnih gljivica oslobadja amonijak što alkalizuje medijum koji sadrži fenol crveno, dovodeći do promene u fuscin roze boju.

4 – REAGENSI

Reagens	Količina	
	#44030	#44130
CANDIFAST	30	-
CANDIFAST ES Twin	-	15
R1: Bočica reagensa 1	35	35
R2 : Bočica reagensa 2	30	30
TC : Bočica kontrole turbiditeta	1	1

Opis
CANDIFAST test: test sa 20 polja, spreman za upotrebu
Svako polje omogućava testiranje jednog uzorka (identifikacija i test osetljivosti)

Red za indentifikaciju
Polje 1 sadrži fenol crveno, aktidion (ACT) i glukozu
Polje 2 do 8 sadrži fenol crveno i različite šećere i to
Polje 3 (GAL) : galaktoza
Polje 4 (TRE) : trehaloza
Polje 5 (MAL) : maltoza
Polje 6 (CEL) : celobioza
Polje 7 (RAF) : rafinoza
Polje 8 (LAC) : laktosa
Polja 9 i 10 su prazna

Red za test rezistentnosti
Polje 1 je polje za kontrolu rasta (C+).
Polja 2 do 8 sadrže različite antimikotike i to:
polje 2 (AB) Amfotricin B (4 µg/mL)
polje 3 (NY) Nistatin (200 IJ/mL)
polje 4 (FCT) Flucitozin (35 µg/mL)
polje 5 (ECZ) Ekonazol (16 µg/mL)
polje 6 (KTZ) Ketokonazol (16 µg/mL)
polje 7 (MCZ) Mikonazol (16 µg/mL)
polje 8 (FCZ) Flukonazol (16 µg/mL)
polja 9 i 10 su prazna

CANDIFAST ES Twin test: test sa 2x10 polja, spreman za upotrebu.
Dva reda polja su identična redu testa rezistentnosti u CANDIFAST testu.
Svaki test omogućava testiranje dva uzorka (samo test rezistentnosti).
Reagens 1: 4-mL bočica puferovanog agaroznog medijuma za razblaženje i identifikaciju.
Govedji ekstrakt 1.3 g/L, kazein pepton 1.8 g/L, ekstrakt gljiva 0.8 g/L, aminokiseline, vitamini, minerali 5,75 g/L, ureja 20g/L, agar 0,52 g/L, antibiotici 1,12 g/L. pH : 6,05 ± 0.1.
Reagens 2: 2-mL bočica YNB medijum (medijum sa gljivičnom azotnom bazom) koji sadrži ureju i fenol crveno za test rezistentnosti.
Govedji ekstrakt 1.3 g/L, kazein pepton 1.8 g/L, ekstrakt gljiva 0.8 g/L, aminokiseline, vitamini, minerali 8,75 g/L, ureja 20g/L, glukoza 8,5 g/L, fenol crveno 0.052 g/L, antibiotici 1,16 g/L. pH : 7,3 ± 0.1
Kontrola turbiditeta : 4-mL bočica rastvora barijum sulfata.

5 – MERE PREDOSTROŽNOSTI

- Predviđeno je da se reagensi koriste isključivo u uslovima *in vitro*, pod nadzorom ovlašćenog lica.
- Uzorci uzeti od pacijenata i inokulisani reagensi su potencijalno zarazni: njima se mora rukovati oprezno, u skladu sa higijenskim pravilima i važećim propisima zemlje u kojoj se ovaj tip proizvoda upotrebljava.
- Reagensima koji sadrže sirovine životinjskog porekla mora se rukovati oprezno.
- Reagensi se ne smeju koristiti nakon isteka roka upotrebe.
- Ostečene ili slabo očuvane reagense ne treba koristiti.

6 – UZIMANJE UZORKA

Kolonije koje se koriste za identifikaciju i test osetljivosti treba da budu sveže (24 – 48 sati stare) i potpuno izolovane na sobnoj temperaturi ili na agaroznom medijumu na temperaturi od 37 °C, najpoželjnije u Petri šolji. Preporučuje se da izolacija bude izvršena na medijumu specifičnom za gljivice (3).

7 – ČUVANJE REAGENASA

U koliko se kit i svi sastojci u njemu čuvaju na temperaturi od 2-8 °C u svom originalnom stanju stabilni su sve do roka naznačenog na kutiji.
Polovina CANDIFAST ES Twin-a može biti čuvana na temperaturi od 2-8 °C, 7 dana u svom originalnom pakovanju zapečaćenom sredstvom za sušenje.

8 – POTREBNI MATERJALI KOJI NISU SADRŽANI U PAKOVANJU

- Parafinsko ulje
- Inkubator na 37 °C
- Sterilne pipete
- Posuda za odlaganje kontaminiranog otpada

9 – PROCEDURA

Ostaviti reagense da dostignu sobnu temperaturu (18-25 °C) pre upotrebe
9.1. Priprema inokuluma
Ezom ili Paster pipetom pokupiti izolovanu koloniju. Inokulisati bočicu reagensa 1 sa kolonijom. Snažno promućkati. Standardizacija inokuluma može se postići na tri različita načina :

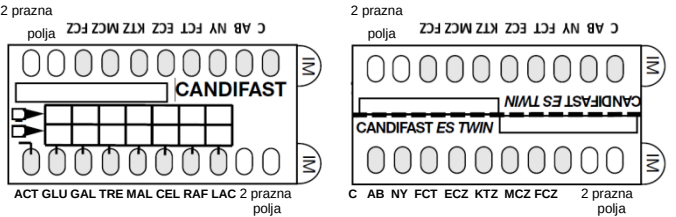
- **U odnosu na bočicu za kontrolu turbiditeta**
Prilagoditi opacitet inokulisanoag reagensa R1 onom iz bočice za kontrolu turbiditeta uz pomoć crnih linija odštampanih na nalepnici bočice.
Ako je reagens jedan svetliji (nedovoljno inokuluma), inokulisati nadalje bočicu sve dok opacitet pokaže jednakost sa kontrolnom bočicom za turbiditet.

Ako reagens pokazuje veći turbiditet (obogaćen inokulum), razblažiti ga reagensom 1 iz novootvorene bočice svo do dobijanja ispravnog turbiditeta.

- **Uz pomoc densitometra**
Potvrditi uz pomoć densitometra da je turbiditet inokulisanoag reagensa 1 1 Mac Farland. Ako je potrebno obaviti kao što je gore navedeno da bi se potvrdio turbiditet.
- **Brojanje u Malassez-ovoj ćeliji**
Moguće je standardizovati inokulum brojanjem gljivica u Malassez-ovoj ćeliji. Mora biti napravljen rastvor od 2500 do 3500 gljivica / mm³

9.2a. Inokulacija CANDIFAST testa
Identifikacija reda
Označiti test kako bi se identifikovao uzorak koji se testira.
Odlepti adhezivnu foliju i razdeliti u svako od prvih 8 polja sledeće:
- 100 µL inokulisanoag standardizovanog R1
- 2 kapi parafinskog ulja
Ponovo prelepti test adhezivnim folijom.
Red testa rezistentnosti
Prvo, inokulisati Reagens 2 sa 100 µL inokulisanoag Standardizovanog Reagensa 1 (vidi 9.1). Onda, odlepti - 100 µL inokulisanoag R2
- 2 kapi parafinskog ulja
Ponovo prelepti test adhezivnom folijom.

9.2b. Inokulacija CANDIFAST ES Twin testa
Prvi red uzoraka
Inokulisati reagens R2 sa 100 µL inokulisanoag standardizovanog reagensa R1.
Označiti oba reda testa.
Odlepti adhezivnu foliju i razdeliti u svako od prvih 8 polja:
- 100 µL inokulisanoag Reagensa 2
- 2 kapi parafinskog ulja
Ponovo prelepti test adhezivnom folijom.
Drugi red uzoraka
Inokulisati na isti način drugi red sa dodatnom bočicom inokulisanoag Reagensa 2 kao sto je 2 kapi parafinskog ulja gore opisano.
Ponovo prelepti test adhezivnom folijom.



9.3. Inkubacija
Inkubaciju testa obavljati na 37°C u toku 24 časa, a ako je potrebno, u zavisnosti od soja, produžiti inkubaciju do 48 ili cak 72 casa. Uzorci na testu se citaju cim se umnože gljivice u kontrolnom polju u testu.

10 – ČITANJE I INTERPRETACIJA

Pročitati svaki test u celosti samo ako u kontrolnom polju (C+ : polje 1 u redu testa rezistentnosti) postoji sledeća izmena boje medijuma:

- **Promena boje u žutu, narandžasto žutu, ili fuscin crvenu*** (*za ureaza pozitivne vrste)

10.1. Red identifikacije

Polje 1 (ACT)
Nalaz je pozitivan kada se konstatuje promena boje medijuma:
- **Promena boje u žutu, narandžasto žutu, ili fuscin crvenu**
Nalaz je negativan kada nema promene boje u žutu, narandžasto-žutu ili fuscin crvenu.
Polja 2 do 8 (GLU do RAF)
Nalaz je pozitivan kada se konstatuje promena boje medijuma:
- **Promena boje u žutu, narandžasto žutu, ili fuscin crvenu**
Nalaz je negativan kada nema promene boje u žutu, narandžasto-žutu ili fuscin crvenu.

Identifikacija gljivica se potvrđuje CANDIFAST testom paralelno sa analizom morfoloskih osobina kolonije.
Za očitavanje rezultata testa koristiti referentnu tablicu ispod ili dijagram priložen u kompletu testa. Oznake na lepljivoj foliji testa mogu takodje biti korišćene : **Prvo pročitati actidion (ACT) polje, zatim locirati poslednje pozitivno polje, desno od njega.** Ime mikroorganizma je odštampano na lepljivoj foliji u preseku aktidion-pozitivnog (nižeg reda) ili aktidion-negativnog (višeg reda) karakteristično za prisutan šećer.

Glijiva	ACT	GLU	GAL	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC
Candida albicans	+	+	+	V	+	-	-	-
Candida albicans (var stellatoidea)	+	+	-	V	+	-	-	-
Candida glabrata	V	+	-	+	-	-	-	-
Candida kefyr	+	+	+	-	-	-	V	+
Candida krusei	V	+	-	-	-	-	-	-
Candida lusitanae	-	+	+	+	V	+	-	-
Candida parapsilosis	-	+	+	-	V	-	-	-
Candida tropicalis	-	+	+	+	+	-	-	-
Saccharomyces	-	+	+	V	V	V	+	-
Cryptococcus or Saccharomyces								
Trichosporon or Rhodotorula genera	V							
V: Promenljive (+ ili -)								

Diferecijalna dijagnoza

Cryptococcus, Trichosporon, i Rhodotorula vrste mogu biti različite po morfološkim karakteristikama.

- Rhodotorula vrste se karakterišu specifičnom oranž-crvenim kolonijama prilikom razvoja na Sabouraud-ovom dekstroza agaru.
- Neki sojevi Cryptococcus vrste mogu također proizvesti crvenkasti pigment. Stoga Cryptococcus vrste treba ispitivati na prisustvo kapsule preparatom Indiskog mastila.
- Trichosporon vrste proizvode pseudohife prilikom razvoja na PCB agar medijumu.

Napomena

- Medju Saccharomyces vrstama, Saccharomyces cerevisiae je vodeća humana patogena vrsta
- Sojevi Saccharomyces boulardii ili Saccharomyces cerevisiae mogu biti izolovani kod pacijenata koji su podvrgnuti tretmanu na bazi glijivica.
- Mikroskopsko ispitivanje može da razlikuje dve vrste:
 - S. cerevisiae su krupnije i loptastog oblika
 - S. boulardii su sitniji po veličini i jajastog ili izduženog oblika.
- Sa CANDIFAST testom neke Cryptococcus vrste mogu da se razviju u prisustvu aktidiona.

11 – KONTROLA KVALITETA

Preporučuje se povremena provera kvaliteta metode, primenom referentnih sojeva, Candida albicans ATCC 90029 i Candida parapsilosis ATCC 22019.

Soj	Inkubacija	Ocekivani rezultati
		ACT GLU GAL TRE MAL CEL RAF LAC C+ AB NY FCT ECZ KTZ MCZ FCZ
C.albicans (ATCC90029)	24 h	+ + + - + - - + - - + - - - -
C.parapsilosis (ATCC22019)	48 h	- + + - - - - - + - - - - - -

12 – UZROČNICI GREŠAKA

- Priprema inokuluma koji je ili previše koncentrovan ili nije dovoljno koncentrovan.
- Priprema inokuluma iz mešavine kultura ili od izolovanih kolonija koje su se razvijale više od 48 časova.
- Očitavanje rezultata testa pre pojavljivanja promene boje na indikatoru rasta.
- Neočitavanje rezultata testa posle inkubacije od 24 ili 48 časova, iako je indikator rasta bio pozitivan.

Generalno, nepoštovanje preporuka datih u uputstvu.

13 – OGRANICENJA

- Ovaj in vitro metod za detekciju rezistentnosti prema antimikoticima, ukazuje na vrednost interakcije antimikotik-glijivica tokom in vivo tretmana (2, 4).
- CANDIFAST procedura je namenjena za identifikaciju i test rezistentnosti prema antimikoticima samo glijivica mukokutanoznog porekla. Stoga se ne koristi za glijivične sojeve izazivače sistemskih mikoza.
- CANDIFAST procedura ne dopušta kategorizaciju na osettljiv - intermedijaran - rezistentan.
- Neki termoosettljivi sojevi izolovani na 20 °C drugačije se razvijaju na 37 °C. U ovom slučaju uzorak se neće razvijati ili će se slabo razvijati. Kao posledica bilo bi veoma otežano ako ne i nemoguće, izvršiti pouzdanu identifikaciju soja ili proceniti rezistentnost na određene antimikotike.
- Za određene sojeve C. lusitanae zakasneli razvoj u TRE polju predstavlja otežanu identifikaciju prema priloženoj tabeli. Identifikacija se također može izvršiti upoređivanjem oznaka na lepljivoj foliji testa.

- Za određene sojeve C. glabrata otežano očitavanje GAL karakteristike čini identifikacija prema priloženoj tabeli otežanom. Identifikacija se također može izvršiti upoređivanjem oznaka na lepljivoj foliji testa.
- Interpretacija testova rezistentnosti ne uzima u obzir zamućenje medijuma koje se može pojaviti nakon inkubacije sa azolnim antimikoticima.

14 – PREDSTAVLJANJE KARAKTERISTIKA

Prikupljanje uzoraka

Sprovedeno je istraživanje na 80 prikupljenih uzoraka (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 i 1 Trichosporon cutaneum). 78 uzoraka je ispravno identifikovano uz pomoć oznaka na lepljivoj foliji testa i dobijena je podudarnost od 97,5 % INTERNATIONAL MICROBIO FUNGICHROM metodom i BIOMERIEUX-ovom API 32C metodom. Podudarnost testa rezistentnosti u poredjenju sa BIORAD-ovim FUNGITEST-om i BIOMERIEUX-ovim ATB Fungus testom bila je 87,4%.

Klinički uzorci

Sprovedeno je istraživanje na 100 sveže izolovanih sojeva iz kliničkih uzoraka uzetih od pacijenata - ljudi zaposlenih u zdravstvu (72 Candida albicans, 9 C. glabrata, 8 C. parapsilosis, 5 C. tropicalis, 3 C. krusei, 1 C. kefyr, 1 C. inconspicua i 1 Saccharomyces spp). 98 uzoraka je ispravno identifikovano u poredjenju sa BIOMERIEUX VITEK metodom. Podudarnost testa rezistentnosti u poredjenju sa BIORAD-ovim FUNGITEST-om i BIOMERIEUX-ovim ATB Fungus testom bila je 98.5%. od 10 nepodudarnosti, 3 su velike greške i 7 malih grešaka. Ove nepodudarnosti obuhvataju 4 uzorka (2 C. glabrata, 1 C. parapsilosis i 1 C. tropicalis) i 3 antimikotika: ekonazol (2 R/I i 1 R/S), ketokonazol (1 R/I i 2 R/S) i mikonazol (4 R/I).

15 – UKLANJANJE OTPADNIH MATERIJALA

Otpad treba bacati u skladu sa higijenskim pravilima i važećim propisima zemlje u kojoj se ovaj tip proizvoda upotrebljava.

16 – LITERATURA

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.

Izvršene promjene Verzije u odnosu na prethodnu verziju su istaknute u svojoj boji.



ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
☎: 33 (0)4 94 88 55 00
http://www.elitechgroup.com