

FUNGIFAST

Identificación de levaduras y pruebas de sensibilidad a antifúngicos

8 pruebas (REF 44408)

30 pruebas (REF 44430)

Registro: CE
1. APLICACIÓN DE USO
El estuche FUNGIFAST permite la identificación de las principales levaduras patógenas humanas, así como la prueba de su susceptibilidad a diversos agentes antifúngicos usados en el tratamiento de las micosis superficiales o sistémicas.
2. INTRODUCCIÓN

Las infecciones por hongos y especialmente las causadas por levaduras han aumentado considerablemente en los últimos años. De las especies de Candida, sólo alrededor del diez son responsables de infecciones en humanos (candidiasis). Estas son los agentes causantes de las infecciones superficiales (candidiasis cutáneas y mucocutáneas) debido principalmente a Candida albicans, e infecciones profundas o sistémicas debidas a C. albicans , así como C. glabrata, C. tropicalis y C. parapsilosis . Las especies de Candida son también responsables de las infecciones nosocomiales. Entre otras levaduras, Cryptococcus neoformans se ha incriminado en las infecciones graves, especialmente en pacientes inmunocomprometidos.
Con la comercialización de nuevos fármacos, y la aparición de micosis resistentes al tratamiento, hay una necesidad de evaluar la actividad de los agentes antifúngicos en levaduras.

3. PRINCIPIO
3.1. Identificación

La identificación de las levaduras se basa en:
La detección de la **presencia o ausencia de diversas enzimas** por medio de reacciones de producción de color. Las actividades enzimáticas se revelan a través de tres tipos de reacción:
Hidrólisis de sustratos cromogénicos
Las actividades de la oxidasa y la peptidasa en las levaduras son responsables de la hidrólisis de los sustratos cromogénicos para liberar para-nitrofenol o para-nitroanilina, ambos compuestos de color amarillo (pocillos β-NAG y PRO).
Asimilación de los sustratos naturales

- La absorción de azúcar es revelada por el cambio de color de púrpura de bromocresol (BCP) de violeta a café o amarillo, o incluso a incoloro (pocillos TRE, MAL, CEL, RAF, LAC)
- La hidrólisis de urea provoca la liberación de amoníaco, que alcaliniza el medio y hace que el rojo de fenol (PR) cambie a fucsia-rosa (pocillo URE)
Oxidación de sustratos sintéticos
La actividad de fenoloxidasa en presencia de ácido cafeico produce un color café (pocillo POX).
Cada galería de FUNGIFAST también incluye un pocillo de control positivo (pocillo C +), el cual revela la asimilación de glucosa.

3.2. Pruebas de sensibilidad

La determinación de la sensibilidad antifúngica se basa en el crecimiento o la ausencia de crecimiento de levaduras en presencia de varios agentes antifúngicos. El crecimiento de la levadura se demuestra por el cambio de color del medio. La fermentación de la glucosa por las levaduras produce a una acidificación del medio que convierte la resazurina presente en el medio de violeta oscuro a violeta, rosa o incoloro.

4. REACTIVOS

Descripción	Cantidad	
	444408	444430
SUSPENSION FUNGI: Frasco de 4 mL de medio semi-agar tamponado para la suspensión e identificación de la colonia, que contiene Bacto Agar, colimicina y vancomicina.	10	35
MES FUNGI: Frasco de 5 mL de medio líquido (medio RPMI modificado) para las pruebas de sensibilidad, que contiene resazurina (indicador de crecimiento) y glucosa.	8	30
IC FUNGI: 4 ml frasco de solución de sulfato de bario para el control de la estandarización del inóculo.	1	1
FUNGIFAST: Galería de 20 pocillos empacada individualmente en una envoltura de aluminio.	8	30

Fila de identificación
– Pocillo 1 (C+): control positivo que contiene glucosa y BCP
– Pocillo 2 (β-NAG): contiene un sustrato cromogénico para N-acetil-β-D glucosaminidasa
– Pocillo 3 (PRO): contiene un sustrato cromogénico para la L-prolina- amidasa
– Pocillo 4 (TRE): contiene trehalosa y BCP
– Pocillo 5 (MAL): contiene maltosa y BCP
– Pocillo 6 (CEL): contiene celobiosia y BCP
– Pocillo 7 (RAF): contiene rafinosa y BCP
– Pocillo 8 (LAC): contiene lactosa y BCP
– Pocillo 9 (POX): contiene un sustrato para fenoloxidasa
– Pocillo 10 (URE): contiene urea y PR.

Fila de pruebas de sensibilidad		
Pocillo 11 es un pozo de control de crecimiento vacío (C+). Del pocillo 12 al 20 contienen diferentes agentes antifúngicos como sigue:		
pocillo 11 (C+): (0 µg/mL)	pocillo 16 (ITZ): (0.125 µg/mL)	
pocillo 12 (AB): (0.5 µg/mL)	pocillo 17 (ITZ): (0.5 µg/mL)	
pocillo 13 (AB): (2 µg/mL)	pocillo 18 (FCZ): (8 µg/mL)	
pocillo 14 (5FC): (4 µg/mL)	pocillo 19 (FCZ): (32 µg/mL)	
pocillo 15 (5FC): (16 µg/mL)	pocillo 20 (VRZ): (1 µg/mL)	
Molécula	Abrev.	Nombre comercial
Anfotericina B (convencional)	AB	FUNGIZONE ABELCET, AMBISONE (liposomal)
Flucitocina	5FC	ANCOTIL
Fluconazol	FCZ	TRIFLUCAN
Itraconazol	ITZ	SPORANOX
Voriconazol	VOR	VFEND

5. PRECAUCIONES

- Los reactivos son para uso diagnóstico in vitro y deben ser manipulados por personal autorizado.
- Las muestras y reactivos inoculados son potencialmente infecciosos; deben ser manejados con precaución, observando las normas de higiene y de la normativa vigente para este tipo de producto en el país de uso.
- Ciertos pocillos de la galería contienen materias primas de origen animal y se deben manejar con precaución.
- Ciertos pocillos de la galería contienen sustancias químicas y deben ser manejados con precaución.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- No utilizar reactivos que han sido dañados o que han sido mal conservados antes de su uso.

6. TOMA DE MUESTRA

La identificación y las pruebas de sensibilidad deben ser realizadas sobre colonias jóvenes (24 horas) y perfectamente aisladas a 37°C en un medio agar, de preferencia en placa de Petri. Es recomendado efectuar el aislamiento en medios específicos de levaduras tal como los medios Sabouraud o los medios cromogénicos (Agar CANDICHROM II, REF 44211).

7. CONSERVACION DE REACTIVOS

- Los reactivos almacenados a 2-8°C en su estado original se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja.
- SUSPENSIÓN FUNGI, MES FUNGI, así como las galerías FUNGIFAST están listos para su uso y debe utilizarse inmediatamente después de abrir.

8. REACTIVOS Y MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- Aceite de parafina
- Pipetas Pasteur estériles
- Incubadora a 37 ° C
- Contenedor para desechos contaminados

9. PROCEDIMIENTO

Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso

9.1. Preparación del inóculo

Picar dos o tres colonias aisladas con un asa bacteriológica o una pipeta Pasteur ocluida. Inocular un frasco de SUSPENSION FUNGI con las colonias. Homogenizar. La estandarización del inóculo se puede realizar de tres formas diferentes:
• Con respecto al frasco TC FUNGI
Ajustar la opacidad de la SUSPENSIÓN FUNGI inoculado a la de FUNGI

TC con la ayuda de las líneas negras impresas en las etiquetas de los frascos. Si el medio de suspensión es más tenue (inóculo insuficiente), sembrar de nuevo el frasco hasta que la opacidad obtenida sea igual a la del frasco de control.

Si el medio de suspensión es más turbia (inóculo enriquecido), diluir con un frasco de SUSPENSION FUNGI recién abierto hasta obtener turbidez correcta.

- Con un Densitómetro
Verificar con un densitómetro que la turbidez del medio inoculado sea igual a 2 Mac Farland. Si es necesario, seguir las indicaciones anteriores para ajustar la turbidez.

9.2. Inoculación de la galería

Fila de identificación

Marque la galería FUNGIFAST para identificar la muestra que se está probando. Levante la cinta adhesiva y agregar en cada uno de los 10 pocillos lo siguiente:

- 100 µL de SUSPENSIÓN FUNGI sembrada y estandarizada. Volver a sellar la galería con la cinta adhesiva.

Fila de pruebas de sensibilidad

Primero, inocular un medio MES FUNGI con 10 µL de SUSPENSION FUNGI inoculado que previamente se haya estandarizado. Homogenizar.

A continuación, levantar la cinta adhesiva y agregar en cada uno de los pocillos de la fila de pruebas de sensibilidad lo siguiente:

- 100 µL de FUNGI MES sembrado.
- 2 gotas de aceite de parafina.
- Volver a sellar la galería con la cinta adhesiva.

9.3. Incubación de la galería

Incubar la galería a 37°C durante 24 horas. Si es necesario y dependiendo de la cepa continuar la incubación durante hasta 48 o incluso 72 horas (§10.1).
Nota: No lea después de una incubación de sólo 18 a 20 horas.

10. LECTURA E INTERPRETACION

10.1 IDENTIFICACION

10.1.1. Validación (pocillo 1)

Después de 24 horas de incubación leer la galería una vez que el pocillo de control positivo ha virado de violeta a **amarillo/incoloro**; si

todavía es violeta, prolongar el tiempo de incubación. No prolongar la incubación durante más de 48 horas a excepción de cuando se sospecha de Cryptococcus neoformans. En este caso, la incubación puede prolongarse hasta un máximo de 72 horas.

10.1.2. Lectura (pocillo 2 al 10)

Leer la prueba de la galería tomando como referencia la "plantilla de color", incluida en el kit.

Los colores son estables durante 4 horas.

La interpretación de la galería se lleva a cabo por un sistema de codificación o por la tabla de identificación incluido en el kit. Si, después de la incubación durante 24 horas, el código obtenido no indica alguna referencia, continúe la incubación durante otras 24hrs.

Si después de la incubación 48 horas el código obtenido sigue sin tener referencia, consulte la tabla de identificación. Para una levadura, todas las características predominantes que aparecen en esta tabla deben ser positivas.

Con el fin de determinar el código, las características se enumeran en tripletes:

- β-NAG, PRO, TRE
- MAL, CEL, RAF
- LAC, POX, URE

A cada característica se atribuye un valor cero si el elemento es negativo. Si el elemento es positivo, este valor depende de su posición en el triplete:

- 1 para la posición 1
- 2 para la posición 2
- 4 para la posición 3.

En el mismo triplete se suman los valores obtenido un número de 3 dígitos. Este número se identifica posteriormente en la lista adjunta.

β-NAG	PRO	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC	POX	URE
+	+	+	+	-	-	-	-	-
1	2	4	1	0	0	0	0	0
7			1			0		

Por ejemplo: el código 710. Este código corresponde a la lista a C.

albicans o C. dubliniensis. Estas dos especies pueden diferenciarse mediante la prueba Elitex Bicolor dubliniensis (REF 44502) Si los resultados obtenidos no corresponden con una especie de levadura de la lista, se debe utilizar una prueba de identificación más completa con el fin de identificar la levadura (ELichrom FUNGI, REF 44328).

Nota: El diagrama impreso en la "plantilla de color" o en la "hoja de resultados" también se puede utilizar como ayuda en el proceso de identificación. Localizar y leer el último pocillo positivo a la derecha del pocillo β-NAG pero antes del pocillo LAC. El nombre del patógeno está impreso en la intersección de la característica positiva (filas inferiores) o característica negativa (filas superiores) de los pocillos PRO y el azúcar identificado.

10.1.3. Diagnóstico diferencial

Con el fin de confirmar la identificación de Candida krusei (código 000) deben llevarse a cabo pruebas complementarias:

- En medio CANDICHRON II; Candida krusei da colonias muy grandes, no vellosas, de aspecto blanco crema, con bordes ondulados e irregulares.
- Prueba Elitex krusei (Ref. 44504) permite la rápida identificación de Candida krusei directamente desde las colonias.

10.2 Pruebas de sensibilidad

Con el fin de facilitar la lectura e interpretación, utilice la "plantilla de color" y "hoja de resultados" incluida en el kit.

10.2.1. Validación (pocillo 11)

Verifique que el medio del control del crecimiento (C+) haya virado a color rosa o incoloro, de lo contrario prolongar el tiempo de incubación hasta 48 ó 72 horas. Con respecto a la identificación (pocillos 1 al 10) de Cryptococcus neoformans, prolongar la incubación a 30°C durante hasta un máximo de 72-96 horas.

10.2.2. Lectura (pocillos 12 al 20)

Un cambio de color del medio, inicialmente de violeta oscuro a violeta, rosa o a incoloro, indica que la cepa inoculada es capaz de crecer en presencia de la concentración del antifúngico probado en ese pocillo.

Sin embargo, cuando no se observa ningún cambio de color, la cepa ha sido inhibida en la concentración del agente antifúngico probado.

10.2.3. Interpretación de los resultados

La cepa es sensible (S), intermedio (I) / Sensible - Dosis Dependiente (S - DD) o Resistentes (R) en función del crecimiento o de la ausencia de crecimiento en presencia de concentraciones críticas de los agentes antifúngicos. Con el fin de facilitar la interpretación, utilizar la hoja de resultados incluida en el kit.

10.2.4. Concentraciones críticas

Las concentraciones críticas (µg/mL) que se utilizan comúnmente para la interpretación de los resultados se dan en la siguiente tabla:

	S	I	SDD	R
Anfotericina*	ND	ND	-	ND
Flucitocina**	≤ 4	8 - 16	-	≥ 32
Itraconazol**	≤ 0.125	-	0.25 - 0.5	≥ 1
Fluconazol**	≤ 8	-	16 - 32	≥ 64
Voriconazol**	≤ 1	-	2	≥ 4

ND: No determinado.

*: Para la anfotericina, un MIC >2 µg/mL indica la posible resistencia. Los criterios de interpretación son:

S: ≤ 1 µg/mL, I: = 2 µg/mL, R: >2 µg/mL.

**:

Las concentraciones determinadas por el CLSI.

Notas: C. krusei es intrínsecamente resistente a fluconazol y sistemáticamente debe ser reportado como (R) para este agente.

11. CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda que la estandarización del método sea verificada de vez en cuando con las cepas de referencia, Candida albicans ATCC 90029 y Candida krusei ATCC 6258. Los valores de MIC esperados se describen en la siguiente tabla:

Cepa	Resultados esperados									
C. albicans ATCC 90028 (24 horas)	C+	βNAG	PRO	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC	POX	URE
	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	C+	AB	AB	5FC	5FC	ITZ	ITZ	FCZ	FCZ	VRZ
	+	S		S	S	S o SDD		S		S
C. krusei ATCC 6258 (24 horas)	C+	βNAG	PRO	TRE	MAL	CEL	RAF	LAC	POX	URE
	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	C+	AB	AB	5FC	5FC	ITZ	ITZ	FCZ	FCZ	VRZ
	+	S		S o I	S o I	S o SDD		SDD o R		S

12. CAUSAS DE ERROR

- Preparación del inóculo desde una mezcla de cultivos.

- Galería y/o medio de aislamiento no incubados a 37°C.

12.1. Identificación

- Etiqueta adhesiva despegada durante la incubación

- Galería incubada más de 48 h, excepto para C. neoformans

12.2. Prueba de sensibilidad

• Preparación de un inóculo demasiado concentrado o demasiado bajo.

• Preparación de un inóculo con colonias aisladas de más de 48 h.

• No adicionar de aceite de parafina en los pozos 11 a 20.

• Lectura de la galería con un tiempo de incubación de 24 horas.

• Lectura de la galería antes de la aparición de un cambio de color del indicador de crecimiento.

• Lectura de la galería 24 o 48 horas tras el viraje de color en el pozo de control de crecimiento. Y de manera general, el no cumplimiento de las recomendaciones de este instructivo.

13. LIMITES DEL METODO

13.1. Identificación

La galería FUNGIFAST solo permite identificar las especies descritas en la base de datos.

13.2. Prueba de sensibilidad

Este es un método para la determinación de la susceptibilidad a agentes antifúngicos y tiene un valor indicativo sobre la interacción antifúngico/levadura durante el tratamiento in vivo.

14. RESULTADOS

Identificación: un estudio comparativo en paralelo fue realizado, con el método AUXACOLOR 2 de Biorad con 94 levaduras (50 Candida albicans / dubliniensis, 15 C. tropicalis, 15 C. glabrata, 4 C. guillermoidii, 3 C. kefyr, 3 C. krusei, 3 C. lusitaniae, 4 C. parapsilosis, 4 Saccharomyces cerevisiae, 3 Cryptococcus neoformans), la mayoría aisladas de muestras clínicas.

93/94 (98,9%) cepas han sido correctamente identificadas:

- 89 cepas fueron correctamente identificadas por ambos métodos.

- 3 cepas Saccharomyces cerevisiae fueron identificadas únicamente con FUNGIFAST.

- 1 cepa C. guillermoidii fue identificada con FUNGIFAST y no identificada con el AUXACOLOR 2.

- 1 cepa C. lusitaniae fue falsamente identificada con FUNGIFAST y no identificada con AUXACOLOR 2.

Prueba de sensibilidad: un estudio comparativo en paralelo fue realizado con el método ATB FUNGUS 3 de Biomérieux con 109 levaduras (55 Candida albicans, 21 C. glabrata, 6 C. parapsilosis, 5 C. tropicalis, 5 C. lusitaniae, 6 C. krusei, 3 C. kefyr, 2 C. guillermoidii, 5 Saccharomyces cerevisiae, 1 Cryptococcus neoformans), la mayoría frescamente aisladas de muestras clínicas.

Los porcentajes de concordancia, son dados en la tabla a continuación:

n= 109	AB	5FC	ITZ	FCZ	VRZ
me	0	12	18	11	1
ME	0	0	7	7	8
MME	0	0	4*	0	0
% Conc	100%	89%	73.4%	83.5%	91.7%

me: menor error

ME: mayor error

MME: muy mayor error

% conc.: % de concordancia

* Las 4 MME fueron obtenidas con cepas de S. cerevisiae.

La concordancia global fue de 87,5%.

15. ELIMINACION DE LOS DESECHOS

Los residuos deben eliminarse conforme a las normas de higiene y la reglamentación en materia de este tipo de reactivos en el país de uso.

16. BIBLIOGRAFIA

Michel-Nguyen A., M.L. Darde, A. Penaud et B. Bouteille.

1997. Evaluation de la galerie colorimétrique FUNGIFAST® I TWIN

identifiant dix espèces de levures d'intérêt médical. J. Mycol. Méd. 7:

81-86. Paugam A., M. Bencherit, A. Fiacre, C. Tourte-Schaeffer and J.

Dupouy-Camet. 1999. Comparison of four commercialized

biochemical systems for clinical yeast identification by colour-

producing reactions. Medical Mycology. 37: 11-17.

Rex J.H., M.A. Pfaller, Walsh T.J., Chaturvedi V., Espinel-Ingroff A.,

Ghannoum M.A., Gosey L.L., Odds F.C., Rinaldi M.G., Sheehan D.J. and

Warnock D.W. 2001. Antifungal Susceptibility Testing: Practical

Aspects and current Challenges. Clinical Microbiology Reviews,

14(4):643-658. Subcommittee of Antifungal Testing of the European

Committee on Antibiotic Susceptibility Testing of the European Society

of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2002. Method for the

determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by Broth

Dilution of Fermentative Yeasts. EUCAST Discussion document E. Dis.

7.1 ESCMID.

FUNGIFAST® es una marca comercial de ELITech MICROBIO

PAIS DE ORIGEN: FRANCIA

FABRICADO EN FRANCIA POR:

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du plateau 19,

allée d'Athènes 83870

SIGNES (FRANCE)



DISTRIBUIDOR AUTORIZADO MX ZONA SURESTE

general_lab@hotmail.com

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau

19 allée d'Athènes

83870 SIGNES

FRANCE

Tel : 33 (0)4 94 88 55 00

Fax : 33 (0)4 94 32 82 61

www.elitechgroup.com

