FUNGIFAST® AFG

Determinación de la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos

12 pruebas (Ref. 44412)

ES-2009-03

CE

I - OBJETIVO

El kit FUNGIFAST AFG permite determinar la sensibilidad de las levaduras - las que se encuentran con mayor frecuencia en patología humana- a los diferentes antifúngicos utilizados en el tratamiento de las micosis superficiales o profundas.

2 - INTERÉS

El aumento de las infecciones fúngicas nosocomiales o comunitarias, la aparición de resistencia a los antifúngicos utilizados habitualmente y la comercialización de nuevas moléculas hacen que sea necesario evaluar el comportamiento de las levaduras frente a los antifúngicos.

Las técnicas de referencias del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), o del EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing), para las pruebas de sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos es un método demasiado largo para utilizarlo como rutina.

La prueba FUNGIFAST AFG utiliza un método líquido colorimétrico en microdilución. Es rápido, con una utilización sencilla, fácil de leer y adaptado a todos los laboratorios de análisis clínicos. Además presenta una buena correlación respecto a los métodos de referencia.

3 - PRINCIPIO

La determinación de la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos se basa en el crecimiento o en la ausencia de crecimiento de estas levaduras en presencia de diferentes antifúngicos que se encuentran en tres o cuatro concentraciones distintas.

Este crecimiento en medio líquido se visualiza por un cambio de color del medio. Las levaduras fermentan la glucosa, lo que implica una reducción del indicador redox que hace virar el medio de violeta oscuro a rosa o a incoloro. Los resultados se interpretan tras 24 horas de incubación, cuando el medio del pocillo control positivo de crecimiento (C+) vira de color. El pocillo correspondiente, libre de antifúngico, se inocula con el medio MES FUNGI sembrado.

La ausencia de viraje en el medio del pocillo control negativo (C-) permite comparar fácilmente el cambio de color en los otros pocillos. El pocillo correspondiente, libre de antifúngico, se inocula con el medio MES FUNGI no sembrado.

4 – REACTIVOS

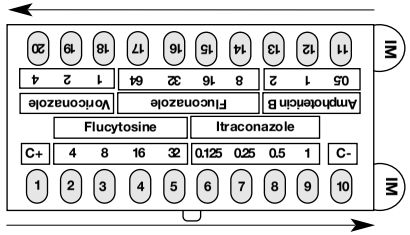
Descripción	Quantidad
SUSPENSION FUNGI : Frasco de 4 mL de medio semi-gelosado tamponado para resuspender las colonias y para la standarización; contiene Bacto Agar, colimicina y vancomicina.	**14**
MES FUNGI : Frasco de 5 mL de medio líquido para el estudio de la sensibilidad (medio RPMI modificado) que contiene resazurina como indicador de crecimiento y glucosa.	**12**
TC FUNGI : Frasco de 4 mL de sulfato de bario para controlar la estandarización del inóculo.	**1**
Galerie FUNGIFAST AFG : Galería de 20 pocillos, para una prueba, envasada individualmente en una bolsa de aluminio.	**12**

Composición de la galería

La galería FUNGIFAST AFG contiene diferentes antifúngicos a las siguientes concentraciones:

pocillo 1 (C+): (0 µg/mL)
pocillo 2 (5FC): (4 µg/mL)
pocillo 3 (5FC): (8 µg/mL)
pocillo 4 (5FC): (16 µg/mL)
pocillo 5 (5FC): (32 µg/mL)
pocillo 6 (ITZ): (0,125 µg/mL)
pocillo 7 (ITZ): (0,25 µg/mL)
pocillo 8 (ITZ): (0,5 µg/mL)
pocillo 9 (ITZ): (1 µg/mL)
pocillo 10 (C-): (0 µg/mL)
pocillo 11 (AB): (0,5 µg/mL)
pocillo 12 (AB): (1 µg/mL)
pocillo 13 (AB): (2 µg/mL)
pocillo 14 (FCZ): (8 µg/mL)
pocillo 15 (FCZ): (16 µg/mL)
pocillo 16 (FCZ): (32 µg/mL)
pocillo 17 (FCZ): (64 µg/mL)
pocillo 18 (VRZ): (1 µg/mL)
pocillo 19 (VRZ): (2 µg/mL)
pocillo 20 (VRZ): (4 µg/mL)

Principio activo	*Abr.*	*Denominación comercial*
Anfotericina B	AB	FUNGIZONA (convencional)
		ABELCET, AMBISONE (liposomalas)
Flucitosina	5FC	ANCOTIL
Fluconazol	FCZ	TRIFLUCAN
Itraconazol	ITZ	SPORANOX
Voriconazol	VOR	VFEND



5 - PRECAUCIONES

• Los reactivos de este kit se destinan al diagnóstico *in vitro* y deben ser manipulados por personal de laboratorio.

• Las muestras y los reactivos sembrados son productos potencialmente infecciosos. Deben ser manipulados con las precauciones habituales respetando las reglas de higiene y con arreglo a la reglamentación local vigente para ese tipo de producto.

• Las galerías contienen sustancias peligrosas y deben manipularse con precaución (para más información, consultar la ficha de datos de seguridad).

• No utilizar los reactivos una vez superada la fecha de caducidad.

• No utilizar los reactivos deteriorados o mal conservados antes de su utilización.

6 – OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

La determinación de la sensibilidad se debe realizar con colonias jóvenes, con una edad máxima de 24 horas tras su aislamiento, y perfectamente aisladas a 37 °C (o a 30 °C para *Cryptococcus neoformans*) en un medio gelosado, preferentemente en placa Petri. Se recomienda efectuar el aislamiento en medios específicos de las levaduras. Se aconseja usar el medio Sabouraud o la gelosa cromogénica CANDICHROM II de ELITech MICROBIO (Ref. 44211 o Ref. 44212).

7 – CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Conservados a 2-8 °C en su estado original, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el kit.

Los reactivos están listos para usar y deben utilizarse inmediatamente tras su apertura.

8 – REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

• Aceite de parafina
• Pipetas PASTEUR estériles / Pipetas de 10 µL y 100 µL
• Estufa a 37 °C y 30 °C (sólo para *Cryptococcus*)
• Recipiente para residuos contaminados

9 - PROCEDIMIENTO

Estabilizar los reactivos a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de usar.

9.1. Preparación del inóculo

Picar dos o tres colonias aisladas idénticas con una pipeta Pasteur con tapón y pasar a un medio SUSPENSION FUNGI. Homogeneizar. La estandarización del inóculo se puede realizar de diferentes formas:

Con un densitómetro:

Con el densitómetro se comprueba que la turbidez del medio de suspensión sembrado es igual a **2 Mac Farland**. Si es necesario, proceder como se ha indicado anteriormente para ajustar la turbidez.

Comparando con el frasco TC FUNGI:

Ajustar la opacidad del medio SUSPENSION FUNGI sembrado con la de TC FUNGI empleando las rayas negras de las etiquetas del frasco. Si el medio de suspensión es más claro (inóculo insuficiente), repetir la siembra hasta obtener una opacidad igual a la del frasco control. Si el medio de suspensión es más turbio (inóculo demasiado rico), diluir utilizando un frasco nuevo de SUSPENSIÓN FUNGI hasta conseguir la opacidad correcta.

Recuento en célula de Malassez:

Se puede estandarizar el inóculo realizando un recuento de las levaduras en una célula de Malassez. Hay que obtener una suspensión de 10^6 a 10^7 levaduras por mL.

9.2. Inoculación de la galería

Control negativo

Identificar claramente una galería FUNGIFAST AFG.

Retirar la etiqueta adhesiva y distribuir en el pocillo 10 (C-):
- 100 µL de medio MES FUNGI no sembrado,
- 2 gotas de aceite de parafina.

Inoculación del medio MES FUNGI

Inocular un medio MES FUNGI con 10 µL de SUSPENSION FUNGI sembrada y previamente estandarizada (§9.1).

Homogeneizar.

Inoculación de la galería

Distribuir en cada uno de los pocillos, excepto en el pocillo 10 (C-) que ya está lleno:
- 100 µL de MES FUNGI previamente sembrado,
- 2 gotas de aceite de parafina.

Colocar la etiqueta adhesiva sobre la galería.

9.3. Incubación de la galería

- Incubar la galería a 37 °C durante 24 horas; si es necesario y dependiendo de las cepas, la incubación se puede mantener hasta 48 horas.

Importante: No leer a las 18-20 horas de incubación. Aunque el pocillo de control positivo haya virado, se debe esperar 24 horas.

- Para las cepas de *Cryptococcus neoformans* incubar la galería a 30 °C y, si es necesario, mantener la incubación hasta 72-96 horas.

10 - LECTURA E INTERPRETACIÓN

Un cambio de color del medio, desde el violeta oscuro inicial a rosa o a incoloro, indica la capacidad de la cepa para desarrollarse a la concentración de antifúngico probada.

Por el contrario, la ausencia de cambio de color del medio indica que la cepa se inhibe a la concentración de antifúngico probada.

10.1 Validación (pocillo control positivo C+)

Comprobar que el medio correspondiente al control de crecimiento (C+) vira a rosa o a incoloro. En caso contrario, mantener la incubación (9.3). Para las cepas de *C. neoformans*, la lectura es posible cuando el medio del pocillo C+ vira a violeta claro.

10.2 Control negativo de lectura (pocillo control negativo C-)

Leer el cambio de color respecto al pocillo de control negativo 10 (C-) que presenta el color inicial del medio.

10.3 Interpretación de los resultados

Para facilitar la prueba, utilice la hoja de resultados incluida en el kit. Los resultados se pueden expresar en concentración mínima inhibitoria o en categorías clínicas.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI es la concentración más baja en la que no existe crecimiento visible de la bacteria (primer pocillo donde el medio se mantiene violeta oscuro).

Categorías clínicas (S / I o S-DD / R)

Se dice que la cepa es Sensible (S), Intermedia (I) / Sensible Dosis Dependiente (S-DD) o Resistente (R) en función de las concentraciones críticas de antifúngico descritas en la siguiente tabla:

Concentraciones críticas en µg/mL para *Candida spp.*:

	S	I	SDD	R
Anfotericina B*	ND	ND	-	ND
Flucitosina**	≤ 4	8-16	-	≥ 32
Itraconazole**	≤ 0,125	-	0,25-0,5	≥ 1
Fluconazole**	≤ 8	-	16-32	≥ 64
Voriconazol **	≤ 1	-	2	≥ 4

ND: No determinada.
*: Para la anfotericina, una CMI > 2 µg/mL indica una probable resistencia.
**: Concentraciones determinadas por el CLSI.

10.4 Advertencias

C. krusei presenta una resistencia intrínseca al fluconazol y debe considerase sistemáticamente (R) a este antifúngico.

11 – CONTROL DE CALIDAD

Para comprobar la estandarización del método, se recomienda efectuar un control de calidad de forma periódica utilizando las cepas de referencia, *Candida albicans* ATCC 90028 y *Candida krusei* ATCC 6258. Los valores esperados de CMI se incluyen en la siguiente tabla:

Antifúngico probado	*Candida albicans* ATCC 90028	*Candida krusei* ATCC 6258
	24 horas	24 horas
Anfotericina B	≤ 0,5 µg/mL	≤ 0,5 µg/mL
Flucitosina	≤ 4 µg/mL	≤ 4-16 µg/mL
Itraconazole	≤ 0,125 - 0,5 µg/mL	0,125-1 µg/mL
Fluconazole	≤ 8 µg/mL	32 - ≥ 64 µg/mL
Voriconazole	≤ 1 µg/mL	≤ 1 µg/mL

12 - CAUSAS DE ERRORES

• Preparación del inóculo a partir de una mezcla de cultivos o con colonias aisladas con una anterioridad superior a 24 horas.
• Incubación de la galería a más de 38 °C.
• Lectura de la galería tras una incubación menor de 24 horas (ej: 18-20 horas).
• Lectura de la galería en ausencia de viraje de color en el pocillo de control de crecimiento.
• Lectura de la galería 24 o 48 horas tras el viraje de color en el pocillo de control de crecimiento.

Y de forma general, no respetar las recomendaciones del presente prospecto.

13 - LÍMITES DEL MÉTODO

• El método de determinación *in vitro* de la sensibilidad a los antifúngicos tiene un valor indicativo sobre la interacción del par antifúngico-levadura en los tratamientos *in vivo*.

• Con el itraconazol, el fluconazol y el voriconazol se puede producir un fenómeno de arrastre, particularmente con la especie *Candida albicans*. Este fenómeno se caracteriza por un viraje de color incompleto (violeta claro) idéntico en todos los pocillos con un mismo antifúngico.

14 - ESPECIFICACIONES

La evaluación de las prestaciones ha sido realizada con la ayuda de varias cepas (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*) aisladas de muestras micológicas proviniendo de varios servicios de centros hospitales o de laboratorios de análisis de medicina de ciudad.

El estudio comparativo ha sido efectuado paralelamente a métodos de referencia, método de micro dilución del EUCAST (a parte por la Anfotericina B) y método E-Test de AB Biodisk. Los resultados en porcentajes de concordancia (en CMI categorizadas) con los métodos de referencia son comunicados en la tabla más abajo:

	AB	**5-FC**	**ITZ**	**FCZ**	**VRZ**	**%Conc.**
	ND	n = 56	n = 56	n = 56	n = 56	-
EUCAST	**ND**	**92,9%**	**69,6%**	**73,2%**	**92,9%**	**82,2%**
	n = 100	n = 99	n = 99	n = 99	n = 100	-
E-Test	**99%**	**90,9%**	**79,8%**	**84,8%**	**97%**	**90,3%**

ND: no determinado
% conc: % de concordancia

Con respecto al tiempo de incubación, 93,3% (97/104) de las cepas han permitido dar un resultado después de 24 horas.

15 – ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

Los residuos se eliminarán con arreglo a las reglas de higiene y a la reglamentación local vigente para este tipo de reactivos.

16 - BIBLIOGRAFÍA

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard. Second edition. Document M27-A2.

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.

FUNGIFAST® es una marca patentada de ELITech MICROBIO

ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
19, allée d'Athènes
83870 SIGNES - FRANCE
Tél. : 04 94 88 55 00
Fax : 04 94 88 55 22

FUNGIFAST® AFG

Determinação da sensibilidade dos fungos aos antifúngicos

12 testes (Réf. 44412)

PT-2009-03

CE

I - FINALIDADE

O dispositivo FUNGIFAST AFG permite determinar a sensibilidade dos fungos mais frequentemente encontrados em patologia humana, a diversos antifúngicos utilizados para tratamento de micoses superficiais ou profundas.

2 – INTERESSE DO DISPOSITIVO

Um aumento na frequência das infecções fúngicas nosocomiais ou comunitárias, o aparecimento de resistência aos antifúngicos habitualmente utilizados, bem como a introdução no mercado de novas moléculas, determinam a necessidade de uma avaliação do comportamento dos fungos perante os antifúngicos.

Os métodos de referência para testar a susceptibilidade a antifúngicos do CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) e do EUCAST (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing) são técnicas laboriosas e não adequadas à rotina laboratorial.

O teste FUNGIFAST AFG utiliza um método líquido colorimétrico em microdiluição. É rápido, simples de utilizar, fácil de ler e adaptado a todos os laboratórios de análises. Além disso, apresenta boa correlação em relação aos métodos de referência.

3 - PRINCÍPIO

A determinação da sensibilidade dos fungos aos antifúngicos baseia-se no crescimento, ou não, destes fungos em presença de diferentes antifúngicos presentes em três ou quatro concentrações.

Este crescimento em meio líquido é visualizado através de uma alteração de cor do meio. A fermentação da glicose pelos fungos provoca uma redução do indicador redox que faz com que o violeta escuro passe a rosa ou a incolor.

Os resultados são interpretados após 24 horas de incubação, desde a alteração de cor do meio do poço de controlo positivo de crescimento (C+). O poço correspondente, isento de antifúngico, é inoculado com o meio MES FUNGI inoculado.

A ausência de alteração de cor no meio do poço de controlo negativo (C-) permite comparar facilmente a alteração de cor nos outros poços. O poço correspondente, isento de antifúngico, é inoculado pelo meio MES FUNGI não inoculado.

4 – REAGENTES

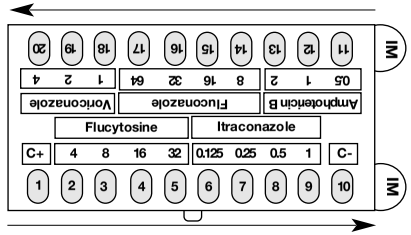
Descrição	Quantidade
SUSPENSION FUNGI : Frasco de 4 mL de meio em semi-gelose tamponado, para colocação em suspensão das colónias e standardização; contém Bacto Agar, colimicina e vancomicina.	14
MES FUNGI : Frasco de 5 mL de meio líquido de estudo da sensibilidade (meio RPMI modificado) contendo resazurina como indicador de crescimento e glicose.	12
TC FUNGI:Frasco de 4 mL de sulfato de bário para controlo de standardização do inóculo.	1
Galerie FUNGIFAST AFG : Galeria de 20 poços, para um teste, individualmente acondicionada em saqueta de alumínio.	12

Composição da galeria

A galeria FUNGIFAST AFG contém diferentes antifúngicos, nas seguintes concentrações:

poço 1 (C+): (0 µg/mL)
poço 2 (5FC): (4 µg/mL)
poço 3 (5FC): (8 µg/mL)
poço 4 (5FC): (16 µg/mL)
poço 5 (5FC): (32 µg/mL)
poço 6 (ITZ): (0,125 µg/mL)
poço 7 (ITZ): (0,25 µg/mL)
poço 8 (ITZ): (0,5 µg/mL)
poço 9 (ITZ): (1 µg/mL)
poço 10 (C-): (0 µg/mL)
poço 11 (AB): (0,5 µg/mL)
poço 12 (AB): (1 µg/mL)
poço 13 (AB): (2 µg/mL)
poço 14 (FCZ): (8 µg/mL)
poço 15 (FCZ): (16 µg/mL)
poço 16 (FCZ): (32 µg/mL)
poço 17 (FCZ): (64 µg/mL)
poço 18 (VRZ): (1 µg/mL)
poço 19 (VRZ): (2 µg/mL)
poço 20 (VRZ): (4 µg/mL)

Princípio activo	*Abr.*	*Denominação comercial*
Anfotericina B	AB	FUNGIZONE (convencional) ABELCET, AMBISONE (com liposomas)
Flucitosina	5FC	ANCOTIL
Fluconazole	FCZ	TRIFLUCAN
Itraconazole	ITZ	SPORANOX
Voriconazole	VOR	VFEND



5 - PRECAUÇÕES

• Os reagentes contidos neste dispositivo destinam-se a diagnóstico *in vitro* e devem ser manipulados por pessoal habilitado para o efeito.

• As amostras e os reagentes inoculados são potencialmente infecciosos, pelo que devem ser manipulados com as precauções habituais, respeitando as regras de higiene e a regulamentação em vigor nos países onde este tipo de produto é utilizado.

• As galerias contêm substâncias perigosas e devem ser manipuladas com precaução (para mais informações é favor reportar-se à ficha de dados de segurança)

• Não utilizar reagentes que tenham ultrapassado o prazo de validade.

• Não utilizar reagentes danificados ou indevidamente conservados antes da utilização.

6 – COLHEITA DAS AMOSTRAS

A determinação da sensibilidade deve ser realizada a partir de colónias jovens, com um máximo de 24 horas após o isolamento, e perfeitamente isoladas a 37 °C (ou a 30 °C para *Cryptococcus neoformans*) em meio de gelose, de preferência sobre placa de Pétri. Recomenda-se efectuar o isolamento em meios específicos para fungos. O meio Sabouraud ou a gelose cromogénica CANDICHROM II de ELITech MICROBIO (Ref. 44211 ou Ref. 44212) são aconselhados.

7 – CONSERVAÇÃO DOS REAGENTES

Quando conservados a 2-8 °C, na embalagem de origem, os reagentes mantêm-se estáveis até ao prazo de validade indicado na embalagem.

Os reagentes estão prontos a usar e devem ser utilizados imediatamente após a abertura.

8 – REAGENTES E MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

• Óleo de parafina
• Pipetas PASTEUR esterilizadas / Pipetas de 10 µL e 100 µL
• Estufa a 37 °C e 30 °C (apenas para *Cryptococcus*)
• Recipiente para resíduos contaminados

9 – MODO DE FUNCIONAMENTO

Levar os reagentes à temperatura ambiente (18-25 °C) antes de usar.

9.1. Preparação do inóculo

Picar duas a três colónias isoladas idênticas, por meio de uma pipeta Pasteur com tampa. Depois, descarregá-las num meio SUSPENSION FUNGI. Homogeneizar. A standardização do inóculo pode ser realizada de várias maneiras:

Por meio de um densitómetro:

Verificar, através do densitómetro, se a turvação do meio de suspensão inoculado é igual a **2 Mac Farland**. Se necessário, proceder como indicado anteriormente para ajustar a turvação.

Com relação ao frasco TC FUNGI:

Ajustar a opacidade do meio SUSPENSION FUNGI inoculado à do TC FUNGI, orientando-se pelos traços pretos das etiquetas do frasco. Se o meio de suspensão for mais claro (inóculo insuficiente), voltar a inocular o frasco até obtenção de uma opacidade igual à do frasco de controlo. Se o meio de suspensão for mais turvo (inóculo em excesso), diluir por meio de um novo frasco SUSPENSION FUNGI até obtenção da opacidade correcta.

Contagem em célula de Malassez:

É possível standardizar o inóculo efectuando uma contagem dos fungos em célula de Malassez. Deve-se obter uma suspensão de 10^6 a 10^7 fungos por mL.

9.2. Inoculação da galeria

Controlo negativo

Identificar correctamente uma galeria FUNGIFAST AFG.
Retirar a etiqueta adesiva e distribuir no poço 10 (C-):
- 100 µL de meio MES FUNGI não inoculado,
- 2 gotas de óleo de parafina.

Inoculação do meio MES FUNGI

Inocular um meio MES FUNGI com 10 µL de SUSPENSION FUNGI inoculada e previamente standardizada (§9.1).
Homogeneizar.

Inoculação da galeria

Distribuir em cada um dos poços, à excepção do poço 10 (C-) já preenchido:
- 100 µL de MES FUNGI previamente inoculado,
- 2 gotas de óleo de parafina.

Voltar a colocar a etiqueta adesiva sobre a galeria.

9.3. Incubação da galeria

- Incubar a galeria a 37 °C durante 24 horas, se necessário e consoante as estirpes, prosseguir a incubação até 48 horas.

Importante: Não efectuar a leitura a 18-20 horas de incubação, mesmo que o poço de controlo positivo tenha mudado de cor, mas aguardar sempre as 24 horas.

- Para as estirpes de *Cryptococcus neoformans* incubar a galeria a 30 °C e, se necessário, prosseguir a incubação até às 72-96 horas.

10 - LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Uma alteração de cor do meio, inicialmente violeta escuro, para rosa ou incolor, traduz a capacidade da estirpe em se desenvolver à concentração testada do antifúngico.

Inversamente, a ausência de alteração de cor do meio indica que a estirpe foi inibida à concentração testada do antifúngico.

10.1 Validação (poço de controlo positivo C+)

Verificar se o meio correspondente ao controlo de crescimento (C+) passou a rosa ou a incolor; se não, prosseguir a incubação (9.3). Para as estirpes de *C. neoformans*, a leitura é possível logo que o meio do poço C + passou ao violeta claro.

10.2 Controlo negativo de leitura (poço de controlo negativo C-)

Registar a alteração de cor com relação ao poço de controlo negativo 10 (C-) que apresenta a cor inicial do meio.

10.3 Interpretação dos resultados

Para maior facilidade, utilizar a folha de resultados incluída na embalagem. Os resultados podem ser expressos em concentração mínima inibitória ou em classificações clínicas.

Concentração mínima inibitória (CMI)

A CMI é determinada pela concentração mais fraca para a qual não se regista crescimento visível da bactéria (primeiro poço em que o meio se mantém violeta escuro).

Classificação clínica (S / I ou S-DD / R)

A estirpe diz-se Sensível (S), Intermédia (I) / Sensível Dependente da Dose (S-DD) ou Resistente (R). em função das concentrações criticas do antifúngico descritas no quadro seguinte:

Concentrações críticas em µg/mL para *Candida spp.*:

	S	I	SDD	R
Amfotericina B*	ND	ND	-	ND
Flucitosina**	≤ 4	8-16	-	≥ 32
Itraconazole**	≤ 0,125	-	0,25-0,5	≥ 1
Fluconazole**	≤ 8	-	16-32	≥ 64
Voriconazole **	≤ 1	-	2	≥ 4

ND : Não determinado.
* : Para a anfotericina, uma CMI > 2 µg/mL indica uma resistência provável.
** : Concentrações determinadas pelo CLSI.

10.4 Observações

C. krusei apresenta uma resistência intrínseca ao fluconazole e deve ser sistematicamente submetida (R) a este antifúngico.

11 – CONTROLO DE QUALIDADE

A fim de verificar a standardização do método, recomenda-se realizar periodicamente um controlo de qualidade, utilizando as estirpes de referência, *Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida krusei* ATCC 6258. Os valores de CMI esperados são fornecidos no quadro seguinte:

Antifúngico testado	*Candida albicans* ATCC 90028	*Candida krusei* ATCC 6258
	24 horas	24 horas
Amphotéricine B	≤ 0,5 µg/mL	≤ 0,5 µg/mL
Flucitosina	≤ 4 µg/mL	≤ 4-16 µg/mL
Itraconazole	≤ 0,125 - 0,5 µg/mL	0,125-1 µg/mL
Fluconazole	≤ 8 µg/mL	32 - ≥ 64 µg/mL
Voriconazole	≤ 1 µg/mL	≤ 1 µg/mL

12 – CAUSAS DE ERRO

• Preparação do inóculo a partir de uma mistura de cultura ou com colónias isoladas de mais de 24 horas.
• Incubação da galeria acima de 38 °C.
• Leitura da galeria antes de um tempo de incubação de 24 horas (p.ex: 18-20 horas).
• Leitura da galeria na ausência de alteração de cor, no poço de controlo de crescimento.
• Leitura da galeria 24 ou 48 horas após a alteração de cor no poço de controlo de crescimento.

E, de uma maneira geral, o incumprimento das recomendações aqui apresentadas.

13 – LIMITAÇÕES DO MÉTODO

• O método de determinação *in vitro* da sensibilidade aos antifúngicos tem um valor indicativo sobre a interacção da ligação antifúngica/fungo, em tratamentos *in vivo*.

• Para o itraconazole, fluconazole e voriconazole pode produzir-se um fenómeno de arrastamento, nomeadamente quanto à espécie *Candida albicans*. Este caracteriza-se por uma alteração de cor incompleta (violeta claro), idêntica em todos os poços de um mesmo antifúngico.

14 - DESEMPENHOS

A avaliação das características de desempenho foi efectuada em estirpes diferentes (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*) isoladas a partir de amostras micológicas obtidas em diferentes departamentos de hospitais e em doentes ambulatórios.

Foi realizado um estudo comparativo paralelo com os métodos de referência: O método de microdiluição EUCAST (excepto para a Anfotericina B) e o método E-Test da AB Biodisk. As percentagens de concordância das categorias estão na tabela seguinte:

	AB	5-FC	ITZ	FCZ	VRZ	%Conc.
	ND	n = 56	n = 56	n = 56	n = 56	-
EUCAST	**ND**	**92,9%**	**69,6%**	**73,2%**	**92,9%**	**82,2%**
	n = 100	n = 99	n = 99	n = 99	n = 100	-
E-Test	**99%**	**90,9%**	**79,8%**	**84,8%**	**97%**	**90,3%**

ND: não determinado
% Conc. : % de concordância de categoria

No que respeita aos tempos de incubação, em 93,3% (97/104) das estirpes houve resultados depois das 24 horas.

15 – ELIMINAÇÃO DOS RESÍDUOS

Os resíduos devem ser eliminados em cumprimento das regras de higiene e da regulamentação em vigor para este tipo de reagentes, no país onde são utilizados.

16 - BIBLIOGRAFIA

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard. Second edition. Document M27-A2.

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.

FUNGIFAST® é uma marca registada de ELITech MICROBIO

ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
19, allée d'Athènes
83870 SIGNES - FRANCE
Tél. : 04 94 88 55 00
Fax : 04 94 88 55 22