

Κιτ qPCR για την ανίχνευση κλινικά σημαντικών ειδών *Candida* – 50 εξετάσεις

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κάθε χρόνο, οι μυκητιασικές λοιμώξεις ευθύνονται για περίπου 1,4 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως (1). Παρά το γεγονός αυτό, οι μυκητιασικές λοιμώξεις συχνά δεν γίνονται επαρκώς κατανοητές και λαμβάνουν μικρότερη δημοσιότητα σε σύγκριση με τις νόσους που προκαλούνται από βακτήρια, ιούς και παράσιτα. Τα άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως οι ασθενείς με καρκίνο ή HIV, καθώς και όσοι έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση μυελού των οστών ή οργάνων, διατρέχουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης διεισδυτικής μυκητιασικής λοίμωξης (2). Οι μυκητιασικοί παθογόνοι μικροοργανισμοί που ενέχουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο είναι τα *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* και *Cryptococcus spp.* (3). Η *Candida* κατατάσσεται στην 4η θέση μεταξύ των συχνότερων λοιμώξεων της κυκλοφορίας του αίματος (4). Οι ασθενείς που αναπτύσσουν σηψαιμία προκαλούμενη από *Candida* έχουν μόνο 60% πιθανότητα επιβίωσης, παρά τη χρήση αντιμυκητιασικών φαρμάκων (5-11). Η *Candida* εμφανίζει ολοένα αυξανόμενη αντοχή στα αντιμυκητιασικά φάρμακα πρώτης και δεύτερης γραμμής (12). Οι λίγες διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές είναι δαπανηρές και μπορεί να είναι τοξικές για ήδη βαρέως πάσχοντες ασθενείς.

Το *Candid* είναι ένα κιτ που περιλαμβάνει 2 πολυπλεκτικές εξετάσεις qPCR, καθεμία από τις οποίες ανιχνεύει 3 συχνά απομονούμενα είδη *Candida*- το *Candid* ανιχνεύει τα *C. albicans*, *C. glabrata* και *C. parapsilosis*, ενώ το *Candid* PLUS ανιχνεύει τα *C. tropicalis*, *C. krusei* και *C. dubliniensis*. Το κιτ *Candid* προορίζεται για χρήση ως βοήθημα στην εκτίμηση και αξιολόγηση ασθενών με υποψία λοίμωξης από *Candida*.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΚΙΤ

Μείγμα εκκινητών/ανιχνευτών <i>Candid</i> (50 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ). (ΚΟΚΚΙΝΟ ΠΩΜΑ) Επισημασμένο με FAM, HEX, Cy5 και ROX (βλ. πίνακα παρακάτω)			
Στόχος	Φθοριόχρωμα	Απορρόφηση (nm)	Εκπομπή (nm)
<i>C. albicans</i>	FAM	494	518
<i>C. glabrata</i>	HEX	535	556
<i>C. parapsilosis</i>	Cy5	646	669
Εσωτερικός Μάρτυρας Εκχύλισης	ROX	575	602

Πίνακας 1. Περιεχόμενα του μείγματος εκκινητών/ανιχνευτών και χαρακτηριστικά των φθοριζουσών χρωστικών

- Θετικός Μάρτυρας *Candid* (*C. albicans*/*glabrata*/*parapsilosis*). (ΚΟΚΚΙΝΟ ΠΩΜΑ)
- DNA Εσωτερικού Μάρτυρα Εκχύλισης (IEC). (ΛΕΥΚΟ ΠΩΜΑ)
- Κύριο μείγμα qPCR. (ΛΕΥΚΟ ΠΩΜΑ)
- Νερό ελεύθερο από RNase/DNase. (ΛΕΥΚΟ ΠΩΜΑ)
- Μείγμα εκκινητών/ανιχνευτών *Candid* PLUS (50 αντιδράσεις). (ΜΠΛΕ ΠΩΜΑ)
Επισημασμένο με FAM, HEX, Cy5 και ROX (βλ. πίνακα παρακάτω)

Στόχος	Φθοριόχρωμα	Απορρόφηση (nm)	Εκπομπή (nm)
<i>C. tropicalis</i>	FAM	494	518
<i>C. krusei</i>	HEX	535	556
<i>Candida dubliniensis</i>	Cy5	646	669
Εσωτερικός Μάρτυρας Εκχύλισης	ROX	575	602

Πίνακας 2. Περιεχόμενα του μείγματος εκκινητών/ανιχνευτών *Candid* PLUS και χαρακτηριστικά των φθοριζουσών χρωστικών

- Θετικός Μάρτυρας *Candid* PLUS (*C. tropicalis*/*C. krusei*/*C. dubliniensis*). (ΜΠΛΕ ΠΩΜΑ)

ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Όργανο qPCR
- Πιπέτες και ρύγχη πιπέτας
- Συσκευή vortex και φυγόκεντρος
- Σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης 1,5 mL
- Πλάκα qPCR και αυτοκόλλητες μεμβράνες σφράγισης πλάκας
- Κιτ εκχύλισης DNA

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ

Το κιτ *Candid* της IMMY πρέπει να φυλάσσεται στους -20°C, όπου παραμένει σταθερό για 18 μήνες από την ημερομηνία κατασκευής. Τα συστατικά πρέπει να διατηρούνται στους 0°C, να μην εκτίθενται σε θερμοκρασίες υψηλότερες από -20°C για περισσότερο από 30 λεπτά κάθε φορά και να αποφεύγονται οι περιττοί επαναλαμβανόμενοι κύκλοι κατάψυξης/απόψυξης. Παρακαλείστε να σημειώσετε ότι η έκθεση στο φως προκαλεί φωτολεύκανση των φθοριζόντων αναφορών και, ως εκ τούτου, μειώνει την ευαισθησία της δοκιμασίας. Η IMMY δεν συνιστά τη χρήση του κιτ μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στη συσκευασία.

ΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΥΛΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το DNA πρέπει να εκχylίζεται από καλλιέργεια ή από κατάλληλο κλινικό δείγμα. Η ορθή εργαστηριακή πρακτική συνιστά τη συμπερίληψη τουλάχιστον ενός θετικού και ενός αρνητικού μάρτυρα εκχύλισης σε κάθε ανάλυση. Τα εκχυλισμένα δείγματα πρέπει να αποθηκεύονται μεταξύ -80°C και -20°C

PIS-00308 αναθ.2

IMMY OLM2007 *Candid* (IVD) IFU

για μακροχρόνια φύλαξη. Παρακαλείστε να λάβετε υπόψη ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις DNA μπορεί να είναι ασταθείς όταν αποθηκεύονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι κατάψυξης/απόψυξης πρέπει να αποφεύγονται. Το κιτ *Candid* της IMMY μπορεί να χρησιμοποιηθεί με οποιοδήποτε δείγμα έχει προετοιμαστεί με μέθοδο εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων συμβατή με την ενίσχυση PCR. Βεβαιωθείτε ότι τα δείγματα είναι κατάλληλα ως προς την καθαρότητα, τη συγκέντρωση και την ακεραιότητα του DNA. Να εκτελείτε πάντοτε τουλάχιστον έναν αρνητικό μάρτυρα (χωρίς πρότυπο) μαζί με τα δείγματα. Για την προετοιμασία ενός αρνητικού μάρτυρα, αντικαταστήστε το πρότυπο DNA με νερό ελεύθερο από RNase/DNase.

ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΕΥΡΟΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Υπό βέλτιστες συνθήκες PCR, οι εκκινητές των κιτ *Candid* της IMMY επιτυγχάνουν αποδόσεις ενίσχυσης >95%. Η εξέταση διαθέτει ευρύ δυναμικό εύρος τουλάχιστον έξι τάξεων μεγέθους και είναι ευαίσθητη σε <1 γονιδίωμα *Candida*.

ΑΝ'ΑΛΥΣΗ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Δεν χρησιμοποιούνται επικίνδυνες ουσίες για την κατασκευή του κιτ qPCR *Candid*. Τα αντιδραστήρια του κιτ δεν ενέχουν κανέναν γνωστό ειδικό κίνδυνο για τον χρήστη. Ενδέχεται να απαιτούνται πρόσθετες χημικές ουσίες και υλικά για τις διαδικασίες που περιγράφονται στο παρόν εγχειρίδιο. Η IMMY συνιστά την προσεκτική ανάγνωση όλων των προειδοποιήσεων, των οδηγιών και των δελτίων δεδομένων ασφαλείας που παρέχονται από τον προμηθευτή. Κατά τον χειρισμό χημικών ουσιών, βιολογικών παραγόντων και άλλων υλικών πρέπει να τηρούνται οι γενικοί κανονισμοί ασφαλείας.

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- Το κιτ qPCR *Candid* προορίζεται για χρήση σε in vitro διαγνωστικές εφαρμογές.
- Η διαδικασία της εξέτασης πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με τις παρεχόμενες «Οδηγίες Χρήσης». Οποιαδήποτε απόκλιση από τα περιγραφόμενα πρωτόκολλα ενδέχεται να οδηγήσει σε αποτυχία της δοκιμασίας ή στην παραγωγή εσφαλμένων αποτελεσμάτων.
- Κατά τον χειρισμό των δειγμάτων πρέπει να τηρούνται οι τυπικές προφυλάξεις και οι τοπικές οδηγίες του εργαστηρίου/ιδρύματος.
- Οι χαμηλές συγκεντρώσεις DNA μπορεί να είναι ασταθείς όταν αποθηκεύονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Η IMMY συνιστά ο χρόνος αποθήκευσης των δειγμάτων πριν από την εξέταση να διατηρείται στο ελάχιστο δυνατό.
- Μην αναμινύετε αντιδραστήρια από διαφορετικά κιτ.
- Για καθεμία από τις δύο αναλύσεις 3-plex (*Candid* και *Candid* PLUS) πρέπει να προετοιμάζεται ξεχωριστό προαναμεμιγμένο μείγμα PCR.
- Μην αναμινύετε τα δύο αντιδραστήρια Εκκινητών/Ανιχνευτών που παρέχονται στο παρόν κιτ.
- Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείται ο κατάλληλος Θετικός Μάρτυρας με την αντίστοιχη ανάλυση (τα σωληνάρια φέρουν χρωματική κωδικοποίηση)
- Μην προσθέτετε τα δύο διαφορετικά προαναμεμιγμένα μείγματα στο ίδιο φρεάτιο αντίδρασης της πλάκας PCR
- Καθώς και οι δύο αναλύσεις (*Candid* και *Candid* PLUS) λειτουργούν στα ίδια κανάλια φθορισμού, βεβαιωθείτε ότι τα φρεάτια της πλάκας αντίδρασης φέρουν την κατάλληλη επισήμανση, ώστε να γίνεται διάκριση μεταξύ των αντίστοιχων στόχων κάθε ανάλυσης.
- Μην αντικαθιστάτε αντιδραστήρια με αντίστοιχα άλλων κατασκευαστών.
- Αποφύγετε την επιμόλυνση των αντιδραστηρίων ακολουθώντας την ορθή εργαστηριακή πρακτική και διαχωρίζοντας κατάλληλα τη ροή εργασίας.
- Βεβαιωθείτε ότι όλα τα επιπλέον απαιτούμενα αναλώσιμα είναι ελεύθερα από RNase/DNase.
- Φοράτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μίας χρήσης κατά την εκτέλεση της εξέτασης.
- Χρησιμοποιείτε ρύγχη πιπέτας μίας χρήσης με φίλτρο για όλες τις μεταφορές με πιπέτα.
- Αποψύχετε τα δείγματα DNA σε πάγο και διατηρείτε τα σε πάγο.
- Να διασφαλίζετε πάντοτε ότι τα αντιδραστήρια *Candid* έχουν αποψυχθεί πλήρως, έχουν αναμειχθεί, έχουν υποβληθεί σε σύντομη φυγοκέντρηση και διατηρούνται σε πάγο.
- Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους.

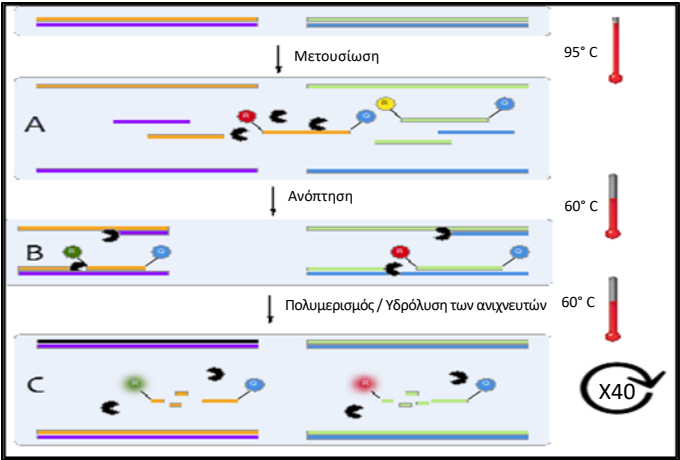
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

- Τα θετικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν τη συνύπαρξη λοίμωξης με άλλους μικροοργανισμούς.
- Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τα αποτελέσματα της εξέτασης *Candid*. Η IMMY συνιστά τη χρήση του παρεχόμενου Εσωτερικού Μάρτυρα Εκχύλισης σε όλες τις εκχυλίσεις δειγμάτων, ώστε να παρακολουθείται η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

Οι επιμέρους σχεδιασμοί εκκινητών και ανιχνευτών για την ανίχνευση έξι κλινικά σημαντικών ειδών *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* και *C. dubliniensis*) έχουν συνδυαστεί σε δύο διακριτές 4-plex αναλύσεις και το DNA τους μπορεί να ανιχνευθεί μέσω των διαφορετικών καναλιών φθορισμού, όπως περιγράφεται στα περιεχόμενα του κιτ. Το *Candid* της IMMY χρησιμοποιεί την πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη χημεία qPCR, η οποία βασίζεται στην ανίχνευση του φωτός που εκπέμπεται από ανιχνευτές υδρόλυσης (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Αρχή της εξέτασης που βασίζεται σε ανιχνευτές υδρόλυσης. Α. Το δίκλωνο γονιδιωματικό DNA, που απεικονίζεται από τους πορτοκαλί και μωβ κλώνους, αποδιατάσσεται καθώς το δείγμα θερμαίνεται για σύντομο χρονικό διάστημα στους 95°C. Εάν προστεθεί πριν από την εκχύλιση του DNA, η ανάλυση περιλαμβάνει επίσης έναν Εσωτερικό Μάρτυρα Εκχύλισης, ο οποίος απεικονίζεται με μπλε και πράσινους κλώνους. **Β.** Κατά τη φάση ανόπτησης (annealing) της PCR, η θερμοκρασία μειώνεται και οι πρόσθιοι (forward) και οπίσθιοι (reverse) εκκινητές (κοντές έγχρωμες γραμμές) υβριδοποιούνται με οποιοδήποτε συμπληρωματικό DNA-στόχο υπάρχει στο δείγμα. Το ίδιο μείγμα αντίδρασης περιέχει επίσης φθοριογόνους ανιχνευτές, οι οποίοι αποτελούνται από ολιγονουκλεοτίδια DNA ειδικά για τον στόχο, επισημασμένα με μία φθορίζουσα χρωστική αναφοράς (R) στο άκρο 5' και έναν αποσβεστήρα (Q). Στην περίπτωση του kit CandID της IMMY, οι ανιχνευτές αυτοί είναι ειδικοί για (i) *C. albicans* (FAM), *C. glabrata* (HEX), *C. parapsilosis* (Cy5) και τον Εσωτερικό Μάρτυρα Εκχύλισης (ROX), με χρήση του προαναμεμιγμένου μείγματος *Candid*D (ΚΟΚΚΙΝΟ πώμα), και (ii) *C. tropicalis* (FAM), *C. krusei* (HEX), *C. dubliniensis* (Cy5) και τον Εσωτερικό Μάρτυρα Εκχύλισης (ROX), με χρήση του προαναμεμιγμένου μείγματος *Candid*D PLUS (ΜΠΛΕ πώμα). **Γ.** Κατά τη φάση πολυμερισμού της PCR, οι υβριδοποιημένοι και δεσμευμένοι ανιχνευτές εκπομπώνονται μέσω της δράσης 5' νουκλεάσης της πολυμεράσης Taq (μαύροι κύκλοι), με αποτέλεσμα τον φυσικό διαχωρισμό των φθοριζόντων αναφορέων (reporters) από τους αποσβεστήρες (quenchers). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός σε μήκος κύματος ειδικό για κάθε φθοριόχρωμα (βλ. Πίνακες 1 και 2), το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί στα αντίστοιχα κανάλια ενός οργάνου qPCR.

ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ CRAG

Το kit περιέχει 2 φιαλίδια θετικού μάρτυρα, καθένα από τα οποία περιέχει πρότυπο που αντιστοιχεί σε τρεις στόχους ειδών *Candida*, σύμφωνα με τους στόχους των αναλύσεων *Candid*D και *Candid*D PLUS. Ο θετικός μάρτυρας υποβάλλεται στον ίδιο χειρισμό με ένα κανονικό εκχύλισμα νουκλεϊκών οξέων και επιβεβαιώνει ότι οι εκκινητές και οι ανιχνευτές για την ανίχνευση ειδών *Candida* λειτουργούν σωστά κατά την εκτέλεση της ανάλυσης. Η συμπερίληψη του θετικού μάρτυρα εξαρτάται από την προτίμηση του τελικού χρήστη και δεν είναι υποχρεωτική σε κάθε εκτέλεση. Ωστόσο, η IMMY συνιστά τη χρήση του σε κάθε εκτέλεση, καθώς παρέχει μεγαλύτερη αξιοπιστία στα αποτελέσματα όταν όλα τα δείγματα είναι αρνητικά. Ο θετικός μάρτυρας δεν απαιτείται να υποβληθεί σε διαδικασία εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων. Πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η διασταυρούμενη επιμόλυνση άλλων δειγμάτων κατά την προσθήκη του θετικού μάρτυρα στην ανάλυση. Ο σχετικός κίνδυνος μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με τη σφράγιση όλων των υπόλοιπων δειγμάτων και των αρνητικών μαρτύρων πριν από τη μεταφορά με πιπέτα του θετικού μάρτυρα στο φρεάτιο του θετικού μάρτυρα.

ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΧΩΡΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟ (NTC)

Για την επιβεβαίωση της απουσίας επιμόλυνσης, πρέπει να περιλαμβάνεται τουλάχιστον μία αντίδραση μάρτυρα χωρίς πρότυπο (NTC) σε κάθε εκτέλεση PCR. Για την αντίδραση αυτή, πρέπει να χρησιμοποιείται νερό ελεύθερο από RNase/DNase αντί για πρότυπο.

ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ (IEC)

Ο Εσωτερικός Μάρτυρας Εκχύλισης (IEC) προστίθεται ώστε να διακρίνονται τα πραγματικά αρνητικά δείγματα από τα ψευδώς αρνητικά δείγματα, τα οποία μπορεί να προκύψουν από αποικοδόμηση των νουκλεϊκών οξέων, αποτυχία του σταδίου εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων, αναστολή της PCR ή δυσλειτουργία του οργάνου qPCR. Οι εκκινητές και ο ανιχνευτής που είναι απαραίτητοι για την ανίχνευση του IEC περιλαμβάνονται στο πολυπλεκτικό μείγμα εκκινητών και ανιχνευτών. Το πρότυπο του IEC προστίθεται είτε στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης/εκχύλισης DNA είτε στο δείγμα αφού αυτό επαναιωρηθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Το IEC θα δώσει τιμή κύκλου ποσοτικοποίησης (Cq) >25, ενώ η διακύμανση εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης του δείγματος και τον βαθμό αραίωσης του δείγματος.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Αφαιρέστε το kit *Candid*D από τον καταψύκτη και αφήστε τα αντιδραστήρια να αποψυχθούν. Τα αποψυγμένα αντιδραστήρια πρέπει να διατηρούνται σε πάγο. Αναδεύστε σύντομα σε συσκευή vortex και φυγοκεντρήστε όλους τους σωληνίσκους αντιδραστηρίων *Cand*ID πριν από τη χρήση.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA

Το DNA του IEC μπορεί να προστεθεί είτε στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης/εκχύλισης DNA είτε στο δείγμα αφού αυτό επαναιωρηθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. **ΜΗΝ προσθέτετε το DNA του Εσωτερικού Μάρτυρα Εκχύλισης απευθείας στο μη επεξεργασμένο βιολογικό δείγμα, καθώς αυτό θα οδηγήσει σε αποικοδόμηση και απώλεια του σήματος.**

1. Προσθέστε 5 µL DNA του IEC σε κάθε δείγμα που βρίσκεται στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης/εκχύλισης DNA, για έκλουση σε 50 µL. Για έκλουση σε διαφορετικούς όγκους, προσαρμόστε ανάλογα τον όγκο του DNA του IEC.

PIS-00308 αναθ.2

IMMY OLM2007 *Candid*D (IVD) IFU

2. Ολοκληρώστε την εκχύλιση DNA σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που συνιστά ο κατασκευαστής.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ PCR

1. Προετοιμάστε ένα προαναμεμιγμένο μείγμα PCR σύμφωνα με τον Πίνακα 3. Βεβαιωθείτε ότι τα προαναμεμιγμένα μείγματα *Candid*D και *Candid*D PLUS προετοιμάζονται χωριστά.

Οι όγκοι δίνονται ανά φρεάτιο αντίδρασης και πρέπει να πολλαπλασιάζονται με τον αριθμό των απαιτούμενων φρεατίων αντίδρασης, συμπεριλαμβανομένου επαρκούς αριθμού αντιδράσεων για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες. Το προετοιμασμένο προαναμεμιγμένο μείγμα PCR πρέπει να αναμειγνύεται καλά και να υποβάλλεται σε σύντομη φυγοκέντρηση.

Συστατικό	Όγκος/Αντίδραση
Κύριο μείγμα qPCR	10 µL
Μείγμα εκκινητών/ανιχνευτών <i>Candid</i> D / Μείγμα εκκινητών/ανιχνευτών <i>Candid</i> D PLUS	2 µL
Νερό ελεύθερο από RNase/DNase	2 µL
Τελικός όγκος	14 µL

Πίνακας 3. Προαναμεμιγμένο μείγμα ανάλυσης *Candid*D / *Candid*D PLUS (όγκος ανά αντίδραση).

Λόγω μικρών αποκλίσεων στην ακρίβεια της πιπέτας, συνιστούμε να προβλέπετε επιπλέον 10% για τον τελικό όγκο· δηλαδή, εάν αναλύτε δέκα δείγματα, παρασκευάστε επαρκές μείγμα αντίδρασης για 11 δοκιμές.

2. Με πιπέτα, μεταφέρετε 14 µL από το προετοιμασμένο προαναμεμιγμένο μείγμα PCR σε κάθε φρεάτιο αντίδρασης σύμφωνα με τη διάταξη της πλάκας qPCR του πειράματός σας.
3. Προετοιμάστε πρότυπα DNA δειγμάτων για καθένα από τα δείγματά σας (βλ. στάδιο εκχύλισης DNA).
4. Με πιπέτα, μεταφέρετε 6 µL προτύπου DNA σε κάθε φρεάτιο σύμφωνα με τη διάταξη της πλάκας του πειράματός σας.
5. Για τα φρεάτια του αρνητικού μάρτυρα χρησιμοποιήστε 6 µL νερού ελεύθερου από RNase/DNase. Για τον θετικό μάρτυρα χρησιμοποιήστε 6 µL Θετικού Μάρτυρα *Candid*D/*Candid*D PLUS, κατά περίπτωση. Ο τελικός όγκος σε κάθε φρεάτιο είναι 20 µL.

Βεβαιωθείτε ότι η πλάκα αντίδρασης PCR έχει σφραγιστεί και έχει υποβληθεί σε σύντομη φυγοκέντρηση πριν από τη μεταφορά της σε επικυρωμένο θερμοκυκλοποιητή για ενίσχυση.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ

1. **Εάν χρησιμοποιείτε όργανο που χρησιμοποιεί το ROX ως παθητική αναφορά, τότε η παθητική αναφορά πρέπει να απενεργοποιηθεί ή να ρυθμιστεί στην επιλογή «none» (καμία παθητική αναφορά), καθώς ο IEC χρησιμοποιεί το κανάλι ROX.**
2. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο του οργάνου σας για οδηγίες σχετικά με τη ρύθμιση μιας διαδικασίας ενίσχυσης. Η ενίσχυση πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 4.

	Βήμα	Χρόνος	Θερμοκρασία
	Ενεργοποίηση ενζύμου	2 λεπτά	95 °C
	Μετουσίωση	5 δευτ.	95 °C
40 κύκλοι	Συλλογή δεδομένων*	20 δευτ.	60 °C

** Τα φθοριογόνα δεδομένα πρέπει να συλλέγονται κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου μέσω των καναλιών FAM, HEX, ROX και Cy5*

Πίνακας 4. Πρωτόκολλο PCR

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο οδηγιών του θερμοκυκλοποιητή σας για πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο λειτουργίας του οργάνου qPCR και την εκτέλεση της ανάλυσης των δεδομένων. Οι αναλύσεις *Candid*D και *Cand*ID PLUS λειτουργούν στα κανάλια FAM, HEX, ROX και Cy5. Επομένως, απαιτείται η κατάλληλη επισημάνση των φρεατίων της πλάκας αντίδρασης. Μην ξεχάσετε να εφαρμόσετε αντιστάθμιση χρωμάτων (colour compensation), εφόσον απαιτείται για το όργανο qPCR που χρησιμοποιείτε.

Είναι σημαντικό να επιθεωρείτε οπτικά τις καμπύλες ενίσχυσης για κάθε δείγμα, ώστε να διασφαλίζεται ότι τα καταγεγραμμένα αποτελέσματα οφείλονται σε πραγματική ενίσχυση και δεν μπορούν να αποδοθούν σε θόρυβο υποβάθρου που καταγράφεται πάνω από τα καθορισμένα κατώφλια.

Σημείωση: Οι εκτιμήσεις των τιμών Cq που αναφέρονται παρακάτω έχουν υπολογιστεί με το κατώφλι τοποθετημένο στο μέσο της λογαριθμικής γραμμικής περιοχής της καμπύλης ενίσχυσης PCR.

ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ

Οι παρεχόμενοι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να καταγράφουν χαρακτηριστικές καμπύλες ενίσχυσης στα κανάλια FAM, HEX και Cy5, με τιμή Cq 28 ± 2. Δεν υπάρχει πρότυπο εσωτερικού μάρτυρα στον θετικό μάρτυρα, επομένως το κανάλι ROX δεν θα πρέπει να καταγράφει κανένα σήμα (επίπεδες καμπύλες ενίσχυσης). Κάθε θετικός μάρτυρας παράγει σήμα που υποδεικνύει ότι η δοκιμασία λειτουργεί σωστά για την ανίχνευση των τριών ειδών *Candida*-στόχων.

ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΧΩΡΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟ (NTC)

Ο NTC θα πρέπει να δίνει επίπεδη γραμμή (επίπεδες καμπύλες ενίσχυσης) σε όλα τα κανάλια. Η παρουσία σημάτων στον NTC μπορεί να υποδηλώνει διασταυρούμενη επιμόλυνση κατά την προετοιμασία της πλάκας.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (ΣΥΝΟΨΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΠΙΝΑΚΕΣ 5 ΚΑΙ 6)

1. Η επιτυχής εκχύλιση του δείγματος υποδηλώνεται από θετικό σήμα στο κανάλι ROX (Cq>25), ενώ χαμηλότερες τιμές Cq υποδηλώνουν αποτελεσματικότερη εκχύλιση.

2. Η παρουσία σήματος στο κανάλι FAM/HEX/Cy5 υποδηλώνει ότι το δείγμα περιέχει *C. albicans*/*glabrata*/*parapsilosis* (για το *Candid**D*) και *C. tropicalis*/*krusei*/*dubliniensis* (για το *Candid**D* PLUS), αντίστοιχα. Η παρουσία σήματος σε περισσότερα από ένα από αυτά τα κανάλια υποδηλώνει μικτή λοίμωξη (μικτά είδη *Candida*).
3. Είναι δυνατόν να ληφθεί σήμα στο κανάλι FAM/HEX/Cy5 χωρίς να καταγραφεί ταυτόχρονα σήμα στο κανάλι ROX. Συνήθως, αυτό συμβαίνει όταν υψηλό φορτίο στόχου οδηγεί σε πρόωμη ενίσχυση (δηλαδή χαμηλές τιμές Cq) και η συσσώρευση του DNA-στόχου αναστέλλει την ενίσχυση του DNA του IEC.
4. Εάν δεν καταγραφεί σήμα σε κανένα από τα κανάλια, η δοκιμασία έχει αποτύχει και δεν είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων.

CandidD: κανάλια ανίχνευσης				
FAM	HEX	Cy5	ROX	Αποτέλεσμα
+	-	-	+	Θετικό δείγμα <i>C. albicans</i> . IEC PASS. Έγκυρο αποτέλεσμα.
-	+	-	+	Θετικό δείγμα <i>C. glabrata</i> . IEC PASS. Έγκυρο αποτέλεσμα.
-	-	+	+	Θετικό δείγμα <i>C. parapsilosis</i> . IEC PASS. Έγκυρο αποτέλεσμα.
-	-	-	-	Μη έγκυρο αποτέλεσμα.

Πίνακας 5. Σύνοψη ερμηνείας δεδομένων: CandidD

Candid PLUS: κανάλια ανίχνευσης				
FAM	HEX	Cy5	ROX	Αποτέλεσμα
+	-	-	+	ΘΕΤΙΚΟ δείγμα <i>C. tropicalis</i> . IEC PASS. Έγκυρο αποτέλεσμα.
-	+	-	+	ΘΕΤΙΚΟ δείγμα <i>C. krusei</i> . IEC PASS. Έγκυρο αποτέλεσμα.
-	-	+	+	ΘΕΤΙΚΟ δείγμα <i>C. dubliniensis</i> . IEC PASS. Έγκυρο αποτέλεσμα.
-	-	-	-	Μη έγκυρο αποτέλεσμα.

Πίνακας 6. Σύνοψη της ερμηνείας δεδομένων: Candid PLUS

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Brown GD *et al.* Sci Transl Med 2012,4(165): 165rv13.
2. Rüping MJ *et al.* Drugs 2008,68(14): 1941-62.
3. Schmiedel Y *et al.* Swiss Med Wkly 2016,146: w14281.
4. Wisplinghoff *et al.* Clin Infect Dis 2004,39: 309-17.
5. Kollef M *et al.* Clin Infect Dis 2012,54: 1739-1746.
6. Hadley S *et al.* Crit Care Med 2002,30(8): 1808-14.
7. Leroy O *et al.* Crit Care Med 2009,37(5): 1612-8.
8. Guzman JA *et al.* Clin Med Res 2011,3: 65-71.
9. Charles PE *et al.* Intensive Care Med 2003,29(12): 2162-9.
10. Nolla-Salas J *et al.* Intensive Care Med 1997,23(1): 23-30.
11. Bognoux ME *et al.* Intensive Care Med 2008,34(2): 292-9.
12. Alexander BD *et al.* Clin Infect Dis 2014,58(5): 754.

ΧΡΗΣΗ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΜΒΟΛΩΝ

	Κατασκευάζεται από
	Ημερομηνία Λήξης
	Συμβουλευθείτε τις Οδηγίες Χρήσης
	Αριθμός Παρτίδας
	Αριθμός αναφοράς προϊόντος
	Για Διαγνωστική Χρήση In Vitro
	Ερεθιστικό
	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος ΕΕ

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗ

Για περισσότερες πληροφορίες, επικοινωνήστε με



IMMY, Inc.

2701 Corporate Centre Dr
Norman, OK 73069 USA
+1 (405) 360-4669 / (800) 654-3639
Φαξ: +1 (405) 364-1058
Email: info@immy.com
www.immy.com



Advena Ltd.

Tower Business Centre, 2nd Flr.,
Tower Street, Swatar,
BKR 4013 Malta

© 2026 IMMY. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.