

Kit per qPCR per il rilevamento di specie di *Candida* clinicamente rilevanti – 50 test

INTRODUZIONE

Ogni anno, le infezioni fungine causano circa 1,4 milioni di decessi in tutto il mondo (1). Nonostante ciò, tali infezioni sono spesso poco comprese e ricevono meno attenzione pubblica rispetto alle malattie causate da batteri, virus e parassiti. Le persone immunocompromesse, come pazienti oncologici e con HIV, o sottoposte a trapianto di midollo osseo o di organi, presentano un rischio più elevato di contrarre un'infezione fungina invasiva (2). I patogeni fungini che rappresentano il rischio maggiore sono *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* e *Cryptococcus spp.* (3). La *Candida* si colloca al 4° posto tra le infezioni del flusso sanguigno più comuni (4). I pazienti che sviluppano setticemia da *Candida* hanno solo il 60% di probabilità di sopravvivenza, nonostante l'uso di farmaci antifungini (5-11). La *Candida* sta diventando sempre più resistente ai farmaci antifungini di prima e seconda linea (12). Le poche opzioni terapeutiche disponibili sono costose e possono essere tossiche per i pazienti già malati.

CandID è un kit contenente 2 test qPCR multiplex, ognuno dei quali rileva 3 specie di *Candida* comunemente isolate, *CandID* rileva *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, mentre *CandID PLUS* rileva *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*. Il kit *CandID* è destinato a essere utilizzato come supporto nella valutazione e nell'analisi di pazienti con sospetta infezione da *Candida*.

CONTENUTI DEL KIT

- Mix di primer/sonde *CandID* (50 REAZIONI). (TAPPO ROSSO)
Etichettati con FAM, HEX, Cy5 e ROX (vedere tabella di seguito)

Target	Fluoroforo	Assorbimento (nm)	Emissione (nm)
<i>C. albicans</i>	FAM	494	518
<i>C. glabrata</i>	HEX	535	556
<i>C. parapsilosis</i>	Cy5	646	669
Controllo interno per l'estrazione	ROX	575	602

Tabella 1. Contenuto del mix di primer/sonde e caratteristiche dei coloranti fluorescenti

- Controllo positivo *CandID* (*C. albicans*/*glabrata*/*parapsilosis*). **(TAPPO ROSSO)**
- DNA di controllo interno per l'estrazione (IEC). **(TAPPO BIANCO)**
- Master mix per qPCR. **(TAPPO BIANCO)**
- Acqua senza RNasi/DNasi. **(TAPPO BIANCO)**
- Mix di primer/sonde *CandID PLUS* (50 reazioni). **(TAPPO BLU)**
Etichettati con FAM, HEX, Cy5 e ROX (vedere tabella di seguito)

Target	Fluoroforo	Assorbimento (nm)	Emissione (nm)
<i>C. tropicalis</i>	FAM	494	518
<i>C. krusei</i>	HEX	535	556
<i>C. dubliniensis</i>	Cy5	646	669
Controllo interno per l'estrazione	ROX	575	602

Tabella 2. Contenuto del mix di primer/sonde *CandID PLUS* e caratteristiche dei coloranti fluorescenti

- Controllo positivo *CandID PLUS* (*C. tropicalis*/*C. krusei*/*C. dubliniensis*). **(TAPPO BLU)**

MATERIALI RICHIESTI NON FORNITI

- Strumento per qPCR
- Pipette e puntali
- Vortex e centrifuga
- Provette per microcentrifuga da 1,5 mL
- Piastra per qPCR e sigilli per piastra
- Kit per l'estrazione del DNA

CONSERVAZIONE DEL KIT

Il kit *CandID* di IMMY deve essere conservato a -20 °C, temperatura alla quale rimane stabile per 18 mesi dalla data di produzione. I componenti devono essere conservati a 0 °C, non devono essere esposti a temperature superiori a -20 °C per più di 30 minuti alla volta e devono essere evitati inutili cicli ripetuti di congelamento/scongelamento. Si noti che l'esposizione alla luce provoca il fotobleaching dei reporter fluorescenti e quindi riduce la sensibilità del test. IMMY sconsiglia l'utilizzo del kit dopo la data di scadenza indicata sulla confezione.

MATERIALE DEL CAMPIONE IDONEO

Il DNA deve essere estratto da coltura o da un campione clinico idoneo. Le buone prassi di laboratorio raccomandano di includere almeno un controllo di estrazione positivo e uno negativo per analisi. I campioni estratti devono essere conservati a temperature comprese tra -80 °C e -20 °C per la conservazione a lungo termine. Si noti che basse concentrazioni di DNA possono risultare instabili se conservate per lunghi periodi. È opportuno evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento. Il kit *CandID* di IMMY può essere utilizzato con qualsiasi campione preparato mediante un metodo di estrazione degli acidi nucleici compatibile con l'amplificazione PCR. Assicurarsi che i campioni siano

idonei in termini di purezza, concentrazione e integrità del DNA. Eseguire sempre almeno un controllo negativo (senza stampo) con i campioni. Per preparare un controllo negativo, sostituire il campione di DNA stampo con acqua senza RNasi/DNasi.

INTERVALLO DINAMICO DEL TEST

In condizioni ottimali di PCR, i primer inclusi nei kit *CandID* di IMMY determinano efficienze di amplificazione superiori al 95%. Il test presenta un ampio intervallo dinamico di almeno sei ordini di grandezza ed è sensibile a meno di un genoma di *Candida*.

ANALISI DEL RISCHIO

Il kit *CandID* per qPCR non contiene sostanze pericolose. I reagenti del kit non presentano rischi specifici noti per l'utilizzatore. Per le procedure descritte nel presente manuale potrebbero essere necessari ulteriori reagenti chimici e materiali. IMMY raccomanda di leggere attentamente tutte le avvertenze, le istruzioni e le schede dei dati di sicurezza dei materiali fornite dal fornitore. È necessario seguire le norme generali di sicurezza quando si maneggiano sostanze chimiche, agenti biologici e altri materiali.

PRECAUZIONI GENERALI

- Il kit *CandID* per qPCR è destinato all'uso nella diagnostica in vitro.
- La procedura di test deve essere eseguita secondo le modalità descritte nelle "Istruzioni per l'uso" fornite. Qualsiasi deviazione dai protocolli descritti può comportare il fallimento del test o la generazione di risultati errati.
- Durante la manipolazione dei campioni è necessario seguire le precauzioni standard e le linee guida locali del laboratorio/istituto.
- Basse concentrazioni di DNA possono risultare instabili se conservate per lunghi periodi. IMMY raccomanda di ridurre al minimo il tempo di conservazione dei campioni prima di effettuare le analisi.
- Non mescolare reagenti provenienti da kit diversi.
- Per ciascuno dei test triplex (*CandID* e *CandID PLUS*) è necessario preparare un premix PCR separato.
- Non mescolare i 2 reagenti Primer/Sonda forniti in questo kit.
- Assicurarsi di utilizzare il controllo positivo appropriato con il relativo test (le provette sono codificate a colori).
- Non caricare i 2 premix diversi nello stesso pozzetto della piastra per PCR.
- Poiché entrambi i test (*CandID* e *CandID PLUS*) operano negli stessi canali di fluorescenza, assicurarsi che i pozzetti della piastra di reazione siano etichettati correttamente, in modo da distinguere i rispettivi target analitici.
- Non utilizzare reagenti di produttori differenti in sostituzione di quelli forniti.
- Evitare la contaminazione dei reagenti seguendo le buone pratiche di laboratorio e separando i flussi di lavoro in modo appropriato.
- Assicurarsi che tutti i materiali di consumo aggiuntivi richiesti siano privi di RNasi/DNasi.
- Durante l'esecuzione del test, indossare indumenti protettivi e guanti monouso.
- Per tutte le operazioni di pipettaggio, utilizzare puntali monouso con filtro.
- Scongellare i campioni di DNA su ghiaccio e mantenerli costantemente su ghiaccio.
- Assicurarsi sempre che i reagenti *CandID* siano completamente scongelati, miscelati, centrifugati e mantenuti su ghiaccio.
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.

LIMITAZIONI DEL TEST

- Risultati positivi non escludono la coinfezione con altri microrganismi.
- L'efficienza dell'estrazione può avere un impatto negativo sui risultati del test *CandID*. IMMY raccomanda di utilizzare il controllo interno per l'estrazione fornito in tutte le estrazioni dei campioni per monitorare questo aspetto.

PRINCIPI DEL TEST

PCR IN TEMPO REALE

Design specifici di primer e sonde per il rilevamento di sei specie di *Candida* clinicamente rilevanti (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*) sono stati combinati in 2 test 4-plex distinti e il loro DNA può essere rilevato attraverso i diversi canali di fluorescenza come descritto nei contenuti del kit.

CandID di IMMY utilizza la chimica qPCR più ampiamente impiegata, basata sul rilevamento della luce emessa dalle sonde di idrolisi (Figura 1).

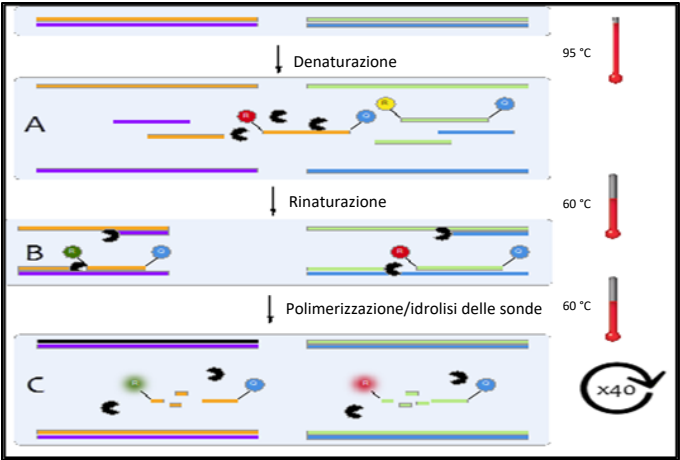


Figura 1. Principio del test basato sulla sonda di idrolisi. **A.** Il DNA genomico a doppio filamento, rappresentato dai filamenti arancione e viola, viene denaturato quando il campione viene brevemente riscaldato a 95 °C. Se aggiunto prima dell'estrazione del DNA, il test include anche un controllo interno per l'estrazione, rappresentato da filamenti blu e verdi. **B.** Durante la fase di rinaturazione della PCR, la temperatura viene ridotta e i primer forward e reverse (brevi linee colorate) si ibridano con qualsiasi DNA target complementare presente. La stessa miscela di reazione contiene anche sonde fluorogeniche, costituite da oligonucleotidi di DNA specifici per il target, etichettati con un colorante reporter fluorescente al 5' (R) e un quencher (Q). Nel caso del kit *CandID* di IMMY, queste sonde sono specifiche per (i) *C. albicans* (FAM), *C. glabrata* (HEX), *C. parapsilosis* (Cy5) e il controllo interno per l'estrazione (ROX), utilizzando il premix *CandID* (tappo ROSSO), e (ii) *C. tropicalis* (FAM), *C. krusei* (HEX), *C. dubliniensis* (Cy5) e il controllo interno per l'estrazione (ROX), utilizzando il premix *CandID* PLUS (tappo BLU). **C.** Durante la fase di polimerizzazione della PCR, le sonde ibridate e legate vengono dislocate e scisse dall'attività nucleasica 5' della *Taq* polimerasi (cerchi neri), con conseguente separazione fisica dei reporter e dei quencher. Ciò determina l'emissione di luce a una lunghezza d'onda specifica del fluoroforo (vedere Tabelle 1 e 2), che può essere rilevata nei canali appropriati di uno strumento per qPCR.

CONTROLLO POSITIVO

Il kit contiene 2 fiale di controllo positivo, ciascuna contenente uno stampo che specifica tre target di specie di *Candida*, corrispondenti ai target del test *CandID* e *CandID* PLUS. Il controllo positivo viene trattato come un normale estratto di acidi nucleici e indica che i primer e le sonde per il rilevamento delle specie di *Candida* funzionano correttamente durante l'analisi. L'inclusione del controllo positivo dipende dalla preferenza dell'utente finale e non è obbligatoria in ogni analisi. Tuttavia, IMMY ne raccomanda l'utilizzo in ogni analisi, in quanto fornisce maggiore affidabilità ai risultati qualora tutti i campioni risultino negativi. Il controllo positivo non necessita di essere sottoposto a una procedura di estrazione degli acidi nucleici. Occorre prestare attenzione a evitare la contaminazione incrociata di altri campioni quando si aggiunge il controllo positivo all'analisi. È possibile ridurre al minimo qualsiasi rischio sigillando tutti gli altri campioni e i controlli negativi prima di pipettare il controllo positivo nel relativo pozzetto.

CONTROLLO SENZA STAMPO (NTC)

Per confermare l'assenza di contaminazione, in ogni analisi di PCR deve essere inclusa almeno una reazione di controllo senza stampo (NTC). Per questa reazione, al posto dello stampo deve essere utilizzata acqua senza RNasi/DNasi.

CONTROLLO INTERNO PER L'ESTRAZIONE (IEC)

Il controllo interno per l'estrazione (IEC) viene aggiunto per distinguere i campioni veramente negativi da quelli falsi negativi, che possono derivare dalla degradazione degli acidi nucleici, da un errore nella fase di estrazione degli acidi nucleici, dall'inibizione della PCR o da un malfunzionamento dello strumento per qPCR. I primer e la sonda necessari per rilevare l'IEC sono inclusi nel mix di primer e sonda multiplex. Lo stampo IEC viene aggiunto al tampone di lisi/estrazione del DNA oppure al campione dopo che questo è stato risospeso nel tampone di lisi. L'IEC fornirà un valore del ciclo di quantificazione (Cq) >25, con una variazione che dipende dall'efficienza dell'estrazione del campione e del livello di diluizione del campione.

PROTOCOLLO DI TEST

Rimuovere il kit *CandID* dal congelatore e lasciare scongelare i reagenti. I reagenti scongelati devono essere mantenuti su ghiaccio. Agitare brevemente con un vortex e centrifugare tutte le provette contenenti i reagenti *CandID* prima dell'uso.

ESTRAZIONE DEL DNA

Il DNA IEC può essere aggiunto al tampone di lisi/estrazione del DNA oppure al campione dopo che questo è stato risospeso nel tampone di lisi. **NON aggiungere il DNA di controllo interno per l'estrazione direttamente al campione biologico non processato, poiché ciò ne provocherebbe la degradazione e la conseguente perdita del segnale.**

- 1. Aggiungere 5 µL di DNA IEC a ciascun campione nel tampone di lisi/estrazione del DNA per l'eluizione in 50 µL. In caso di eluizione in volumi diversi, regolare di conseguenza il volume del DNA IEC.
- 2. Eseguire l'estrazione del DNA seguendo i protocolli raccomandati dal produttore.

PROTOCOLLO DI RILEVAMENTO MEDIANTE PCR

- 1. Preparare un premix per PCR secondo la Tabella 3. Assicurarsi che i premix *CandID* e *CandID* PLUS vengano preparati separatamente.

I volumi sono indicati per pozzetto e devono essere moltiplicati per il numero di pozzetti necessari, includendo un numero sufficiente di reazioni per i controlli positivi e negativi. Il premix per PCR preparato deve essere miscelato accuratamente e sottoposto a una breve centrifugazione.

Componente	Volume/Reazione
Master mix per qPCR	10 µL
Mix di primer/sonde <i>CandID</i> / <i>CandID</i> PLUS	2 µL
Acqua senza RNasi/DNasi	2 µL
Volume finale	14 µL

Tabella 3. Premix di test *CandID* / *CandID* PLUS (volume per reazione).
A causa delle piccole variazioni nell'accuratezza del pipetaggio, si consiglia di prevedere un ulteriore 10% per il volume finale, ovvero, se si analizzano dieci campioni, preparare una quantità di mix di reazione sufficiente per 11 test.

- 2. Pipettare 14 µL di premix per PCR preparato in ciascun pozzetto, secondo la configurazione della piastra sperimentale per qPCR.
- 3. Preparare gli stampi di DNA per ciascun campione (vedere la fase di estrazione del DNA).
- 4. Pipettare 6 µL di premix per stampo di DNA in ciascun pozzetto, secondo la configurazione della piastra sperimentale.
- 5. Per i pozzetti di controllo negativo utilizzare 6 µL di acqua senza RNasi/DNasi. Per il controllo positivo utilizzare 6 µL di Controllo positivo *CandID*/ *CandID* PLUS, a seconda dei casi. Il volume finale in ciascun pozzetto è pari a 20 µL.

Assicurarsi che la piastra di reazione per PCR sia sigillata e sottoposta a una breve centrifugazione prima di trasferirla in un termociclatore validato per l'amplificazione.

PROTOCOLLO DI AMPLIFICAZIONE

- 1. **Se si utilizza uno strumento che usa ROX come riferimento passivo, questo deve essere disattivato o impostato su "nessuno", poiché lo standard IEC utilizza il canale ROX.**
- 2. Per le istruzioni sulla configurazione di un'esecuzione di amplificazione, consultare il manuale del proprio strumento. L'amplificazione deve essere effettuata secondo le condizioni specificate nella Tabella 4.

	Passaggio	Tempo	Temperatura
	Attivazione enzimatica	2 minuti	95 °C
Cicli x40	Denaturazione	5 secondi	95 °C
	Raccolta dati*	20 secondi	60 °C

** I dati fluorogenici devono essere raccolti durante questa fase attraverso i canali FAM, HEX, ROX e Cy5*

Tabella 4. Protocollo PCR

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Per informazioni sul funzionamento dello strumento per qPCR e sull'analisi dei dati, consultare il manuale di istruzioni del termociclatore. Entrambi i test *CandID* e *CandID* PLUS operano nei canali FAM, HEX, ROX e Cy5. Pertanto, è necessaria un'etichettatura appropriata dei pozzetti della piastra di reazione. Ricordarsi di applicare la compensazione del colore, se appropriata al proprio strumento per qPCR.

È importante esaminare visivamente i grafici di amplificazione per ciascun campione per assicurarsi che i risultati registrati siano dovuti a una vera amplificazione e non possano essere attribuiti al rumore di fondo registrato al di sopra delle soglie definite.

Nota: le stime di Cq riportate di seguito sono calcolate con la soglia posizionata al centro dell'intervallo log-lineare della curva di amplificazione PCR.

CONTROLLO POSITIVO

I controlli positivi forniti devono ciascuno generare curve di amplificazione caratteristiche attraverso i canali FAM, HEX e Cy5, con Cq pari a 28 ± 2. Non è presente alcuno stampo di controllo interno nel controllo positivo, pertanto il canale ROX dovrebbe registrare un'assenza di segnale (curve di amplificazione piatte). Ciascun controllo positivo genera un segnale per indicare che il test funziona correttamente per l'individuazione di tre specie target di *Candida*.

CONTROLLO SENZA STAMPO (NTC)

L'NTC deve dare una linea piatta (curve di amplificazione piatte) in tutti i canali. I segnali rilevati dall'NTC potrebbero indicare una contaminazione incrociata durante la configurazione della piastra.

DATI DEI CAMPIONI (RIEPILOGATI NELLE TABELLE 5 E 6)

- 1. Un'estrazione del campione avvenuta correttamente è indicata da un segnale positivo nel canale ROX (Cq>25), con Cq più bassi indicativi di un'estrazione più efficiente.
- 2. La presenza di un segnale nel canale FAM/HEX/Cy5 indica che il campione contiene *C. albicans*/*glabrata*/*parapsilosis* (per *CandID*), e *C. tropicalis*/*krusei*/*dubliniensis* (per *CandID* PLUS), rispettivamente. La presenza di segnale in più di uno di questi canali indica un'infezione mista (specie miste di *Candida*).
- 3. È possibile ottenere un segnale nel canale FAM/HEX/Cy5 senza registrare contemporaneamente un segnale nel canale ROX. In genere, ciò si verifica quando un'elevata carica di target determina un'amplificazione precoce (ovvero Cq bassi) e l'accumulo di DNA target inibisce l'amplificazione del DNA IEC.

4. Se non si rileva alcun segnale in nessuno dei canali, il test non è andato a buon fine e non è possibile trarre conclusioni.

CandID: canali di rilevamento				
FAM	HEX	Cy5	ROX	Risultato
+	-	-	+	Campione POSITIVO per <i>C. albicans</i> . IEC SUPERATO. Risultato valido.
-	+	-	+	Campione POSITIVO per <i>C. glabrata</i> . IEC SUPERATO. Risultato valido.
-	-	+	+	Campione POSITIVO per <i>C. parapsilosis</i> . IEC SUPERATO. Risultato valido.
-	-	-	-	Risultato non valido.

Tabella 5. Riepilogo dell'interpretazione dei dati: CandID

CandID PLUS: canali di rilevamento				
FAM	HEX	Cy5	ROX	Risultato
+	-	-	+	Campione POSITIVO per <i>C. tropicalis</i> . IEC SUPERATO. Risultato valido.
-	+	-	+	Campione POSITIVO per <i>C. krusei</i> . IEC SUPERATO. Risultato valido.
-	-	+	+	Campione POSITIVO per <i>C. dubliniensis</i> . IEC SUPERATO. Risultato valido.
-	-	-	-	Risultato non valido.

Tabella 6. Riepilogo dell'interpretazione dei dati: CandID PLUS

RIFERIMENTI

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.

UTILIZZO DEI SIMBOLI INTERNAZIONALI

	Produttore
	Data di scadenza
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Numero di lotto
	Numero di riferimento del prodotto
	Diagnostica in vitro
	Irritante
	Rappresentante autorizzato nell’UE

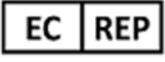
INFORMAZIONI SUL PRODUTTORE

Per ulteriori informazioni si prega di contattare



IMMY, Inc.

2701 Corporate Centre Dr
Norman, OK 73069 Stati Uniti
+1 (405) 360-4669 / (800) 654-3639
Fax: +1 (405) 364-1058
E-mail: info@immy.com
www.immy.com

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

© 2026 IMMY. Tutti i diritti riservati.