IMMY

CE IVD

Cand-ID

REF.NR.: OLM2007

qPCR-sett for påvisning av klinisk relevante *Candida*-arter – 50 tester

INTRODUKSJON

Hvert år er soppinfeksjoner ansvarlige for rundt 1,4 millioner dødsfall over hele verden (1). Til tross for dette blir soppinfeksjoner ofte misforstått og får mindre offentlig oppmerksomhet sammenlignet med sykdommer forårsaket av bakterier, virus og parasitter. Personer med svekket immunforsvar, som kreft- og HIV-pasienter, eller de som har gjennomgått benmargs- eller organtransplantasjoner, har størst risiko for å lide av en invasiv soppinfeksjon (2). De sopppatogenene som utgjør størst risiko er *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* og *Cryptococcus spp.* (3). Candida er rangert som nummer 4 blant de vanligste blodinfeksjonene (4). Pasienter som utvikler sepsis forårsaket av *Candida* har bare 60 % sjanse for å overleve, til tross for bruk av soppdrepende medisiner (5–11). *Candida* blir stadig mer resistent mot førstelinje- og andrelinjebehandling med soppdrepende medisiner (12). De få tilgjengelige behandlingsalternativene er dyre og kan være giftige for allerede syke pasienter.

Cand ID er et sett som inneholder to multipleks qPCR-tester, som hver detekterer tre vanlig isolerte *Candida*-arter. *Cand* ID detekterer *C. albicans, C. glabrata* og *C. parapsilosis,* mens *Cand* ID PLUS detekterer *C. tropicalis, C. krusei* og *C. dubliniensis. Cand* ID-settet er beregnet for bruk som et hjelpemiddel i vurdering og evaluering av pasienter med mistenkt Candida-infeksjon.

INNHOLD I SETT

- *CandID* Primer/Probe-blanding (50 REAKSJONER). (RØD HETTE)
  FAM-, HEX-, Cy5- og ROX-merket (se tabellen nedenfor)

Mål	Fluorofor	Absorpsjon (nm)	Utslipp (nm)
C. albicans	FAM	494	518
C. glabrata	HEX	535	556
C. parapsilose	Cy5	646	669
Intern ekstraksjonskontroll	ROX	575	602

Tabell 1. Innhold av primer-/probeblanding og egenskaper ved fluorescerende fargestoffer

- *Cand* ID Positiv ktrl (*C. albicans/glabrata/parapsilosis*). (**RØD HETTE**)
- Intern ekstraksjonskontroll av DNA (IEC). (**HVIT HETTE**)
- qPCR-masterblanding. (**HVIT HETTE**)
- RNase/DNase-fritt vann. (**HVIT HETTE**)
- *Cand* ID PLUS Primer/Probe-blanding (50 reaksjoner). (**BLÅ HETTE***)*
  FAM-, HEX-, Cy5- og ROX-merket (se tabellen nedenfor)

Mål	Fluorofor	Absorpsjon (nm)	Utslipp (nm)
C. tropicalis	FAM	494	518
C. krusei	HEX	535	556
C. dubliniensis	Cy5	646	669
Intern ekstraksjonskontroll	ROX	575	602

Tabell 2. *CandID* PLUS Primer/Probe-blandingens innhold og egenskaper fluorescerende fargestoffer

- *CandID* PLUS positiv kontroll (*C. tropicalis* / *C. krusei* / *C. dubliniensis*). (**BLÅ HETTE**)

MATERIALER SOM KREVES, MEN IKKE FØLGER MED

- qPCR-instrument
- Pipetter og spisser
- Vortex og sentrifuge
- 1,5 ml mikrosentrifugerør
- qPCR-plate og platetetninger
- DNA-ekstraksjonssett

OPPBEVARING AV SETT

IMMYs *Cand* ID-sett skal oppbevares ved -20 °C, hvor det er stabilt i 18 måneder fra produksjonsdato. Komponenter bør oppbevares ved 0 °C, ikke utsettes for temperaturer over -20 °C i mer enn 30 minutter av gangen, og unødvendig gjentatt frysing/tining bør unngås. Vær oppmerksom på at lyseksponering fører til fotobleking av de fluorescerende reporterlysene og dermed reduserer analysens følsomhet. IMMY anbefaler ikke bruk av settet etter utløpsdatoen som er angitt på pakken.

EGNET SAMPLE-MATERIALE

DNA bør ekstraheres fra kultur eller egnet klinisk prøve. God laboratoriepraksis anbefaler å inkludere minst én positiv og negativ ekstraksjonskontroll per analyse. Ekstraherte prøver bør lagres mellom -80 °C og -20 °C for langtidslagring. Vær oppmerksom på at lave konsentrasjoner av DNA kan være ustabile hvis de oppbevares over lengre tid. Gjentatte fryse-/tinesykluser bør unngås.
IMMYs *Cand* ID-sett kan brukes med enhver prøve fremstilt med en nukleinsyreekstraksjonsmetode som er kompatibel med PCR-amplifisering. Sørg for at prøvene er passende med tanke på renhet, konsentrasjon og DNA-integritet. Kjør alltid minst én negativ kontroll (uten mal) med prøvene. For å forberede en negativ kontroll erstatter du mal-DNA-prøven med RNase/DNase-fritt vann.

DYNAMISK OMRÅDE AV TESTEN

Under optimale PCR-forhold resulterer primerne i IMMYs *Cand* ID-sett i amplifikasjonseffektiviteter på >95 %. Testen har et bredt dynamisk område på minst seks størrelsesordener og er følsom for <1 *Candida*-genom.

RISIKOANALYSE

Det er ingen farlige stoffer inkludert i produksjonen av *Cand* ID qPCR-settet. Kitreagensene utgjør ingen kjent spesifikk risiko for brukeren. Ytterligere kjemikalier og materialer kan være nødvendige for prosedyrene beskrevet i denne håndboken. IMMY anbefaler at du leser alle advarsler, instruksjoner og sikkerhetsdatablader fra leverandøren nøye. Generelle sikkerhetsforskrifter må følges ved håndtering av kjemikalier, biologiske farer og andre materialer.

GENERELLE FORHOLDSREGLER

- *Cand* ID qPCR-settet er til in vitro-diagnostisk bruk.
- Testprosedyren skal utføres som beskrevet i den medfølgende «Bruksanvisningen». Ethvert avvik fra de skisserte protokollene kan føre til analysefeil eller generering av feilaktige resultater.
- Standard forholdsregler og lokale retningslinjer fra laboratoriet/institusjonen bør følges ved håndtering av prøver.
- Lave konsentrasjoner av DNA kan være ustabile hvis de lagres over lengre tid. IMMY anbefaler at oppbevaringstiden for prøvene minimeres før testing.
- Ikke bland reagenser fra forskjellige sett.
- En separat PCR-premiks må klargjøres for hver av 3-plex-analysene (*Cand* ID og *Cand* ID PLUS).
- Ikke bland de to primer-/probereagensene som følger med i dette settet.
- Sørg for at riktig positiv kontroll brukes med tilhørende analyse (rørene er fargekodet)
- Ikke last de to forskjellige premiksene inn i samme reaksjonsbrønn på PCR-platen
- Ettersom begge analysene (*CandID* og *CandID* PLUS) opererer i de samme fluorescenskanalene, må du sørge for at brønnene på reaksjonsplaten er merket riktig, slik at du kan skille mellom de respektive analysemålene.
- Ikke bytt ut reagenser fra forskjellige produsenter.
- Unngå reagensforurensning ved å følge god laboratoriepraksis og atskille arbeidsflyten etter behov.
- Sørg for at alle ekstra nødvendige forbruksvarer er RNase-/DNase-frie.
- Bruk verneklær og engangshansker når du utfører testen.
- Bruk engangsfilterspisser til all pipettering.
- Tin DNA-prøvene på is og oppbevar dem på is.
- Sørg alltid for at *Cand* ID-reagenser tines grundig, blandes, sentrifugeres og oppbevares på is.
- Ikke bruk reagenser etter utløpsdatoen.

ANALYSEBEGRENSNINGER

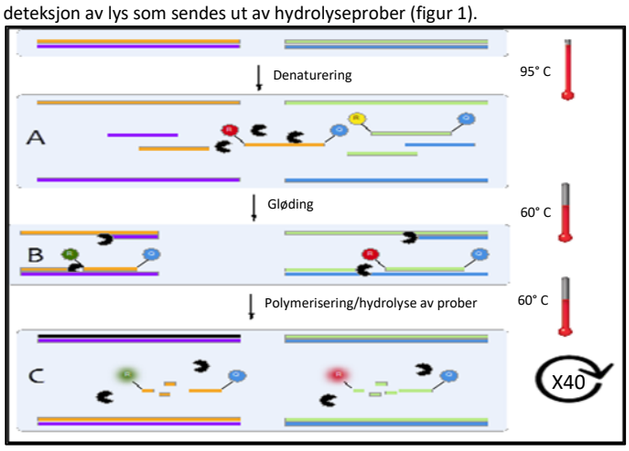
- Positive resultater utelukker ikke koinfeksjon med andre organismer.
- Ekstraksjonseffektivitet kan ha en negativ innvirkning på *Cand* ID-testresultatene. IMMY anbefaler at den interne ekstraksjonskontrollen som er gitt, brukes i alle prøveekstraksjoner for å overvåke dette.

PRINSIPPER FOR TESTEN

SANNTIDSPCR

Individuelle grunder- og probedesign for deteksjon av seks klinisk relevante *Candida*-arter (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* og *C. dubliniensis*) har blitt kombinert i to distinkte 4-plex-analyser, og DNA-et deres kan detekteres gjennom de forskjellige fluorescerende kanalene som beskrevet i settinnholdet.

IMMYs *Cand* ID benytter seg av den mest brukte qPCR-kjemien, som er basert på deteksjon av lys som sendes ut av hydrolyseprober (figur 1).



Figur 1. Prinsipp for hydrolyseprobebasert test. A. Dobbelttrådet genomisk DNA, representert av de oransje og lilla trådene, denatureres når prøven kort varmes opp til 95°C. Hvis analysen tilsettes før DNA-ekstraksjon, inneholder den også en intern ekstraksjonskontroll, representert av blå og grønne tråder. **B.** I løpet av annealingsfasen av PCR reduseres temperaturen, og forover- og reversprimere (korte fargede linjer) hybridiserer til eventuelt komplementært

mål-DNA som er til stede. Den samme reaksjonsblandingen inneholder også fluorogene prober, som består av målspesifikke DNA-oligonukleotider merket med et 5`-fluorescerende reporterfargestoff (R) og en quencher (Q). Når det gjelder IMMYs *Cand* ID-sett, er disse probene spesifikke for (i) *C. albicans* (FAM), *C. glabrata* (HEX), *C. parapsilosis* (Cy5) og den interne ekstraksjonskontrollen (ROX), ved bruk av *Cand* ID-premiksen (RØD hette), og (ii) *C. tropicalis* (FAM), *C. krusei* (HEX), *C. dubliniensis* (Cy5) og den interne ekstraksjonskontrollen (ROX), ved bruk av *Cand* ID PLUS-premiksen (BLÅ hette). **C.** I løpet av polymerisasjonsfasen av PCR-en blir hybridiserte bundne prober fortrengt og spaltet av 5'-nukleaseaktiviteten til *Taq*-polymerasen (svarte sirkler), noe som resulterer i fysisk separasjon av reporterene og quencherne. Dette resulterer i lysutslipp ved en fluoroforspesifikk bølgelengde (se tabell 1 og 2), som kan detekteres i de aktuelle kanalene i et qPCR-instrument.

POSITIV KONTROLL

Settet inneholder 2 hetteglass med positiv kontroll, som hver inneholder en mal som spesifiserer tre *Candida*-arters mål, som korresponderer med *Cand* ID- og *Cand* ID PLUS-analysemålene. Den positive kontrollen håndteres som et vanlig nukleinsyreekstrakt og indikerer at primerne og probene for å detektere *Candida*-arter fungerer som de skal i kjøringen. Inkludering av den positive kontrollen avhenger av sluttbrukerens preferanser og er ikke obligatorisk i alle kjøringer. IMMY anbefaler imidlertid bruk i hver kjøring, da det gir større sikkerhet i resultatene hvis alle prøvene er negative. Den positive kontrollen trenger ikke å bli utsatt for en nukleinsyreekstraksjonsprosedyre. Man bør være forsiktig for å unngå krysskontaminering av andre prøver når den positive kontrollen tilsettes kjøringen. Enhver risiko kan minimeres ved å forsegle alle andre prøver og negative kontroller før den positive kontrollen pipetteres over i den positive kontrollbrønnen.

INGEN MALKONTROLL (NTC)

For å bekrefte fraværet av kontaminering må minst én kontrollreaksjon uten mal (NTC) inkluderes i hver PCR-kjøring. For denne reaksjonen bør RNase/DNase-fritt vann brukes i stedet for mal.

INTERN UTSUGNINGSKONTROLL (IEC)

Den interne ekstraksjonskontrollen (IEC) legges til for å skille ekte negative prøver fra falskt negative prøver, noe som kan skyldes nedbrytning av nukleinsyre, feil i nukleinsyreekstraksjonstrinnet, PCR-hemming eller funksjonsfeil i qPCR-instrumentet. Primerne og proben som er nødvendige for å detektere IEC er inkludert i multiplexprimer- og probeblandingen. IEC-malen tilsettes enten DNA-lyse-/ekstraksjonsbufferen eller prøven når den er resuspendert i lysisbuffer. IEC vil gi en kvantifiseringssyklus (Cq)-verdi på >25, med variasjonen avhengig av effektiviteten til prøveekstraksjonen og nivået av prøvefortynning.

TESTPROTOKOLL

Ta *Cand* ID-settet ut av fryseren, og la reagensene tine. Tinte reagenser må oppbevares på is. Virvle og sentrifuger alle *Cand* ID-reagensrørene kort før bruk.

DNA-EKSTRAKSJON

IEC-DNA kan tilsettes enten DNA-lyse-/ekstraksjonsbufferen eller prøven når den er resuspendert i lysisbuffer.
IKKE tilsett intern ekstraksjonskontroll-DNA direkte til den ubehandlede biologiske prøven, da dette vil føre til nedbrytning og signaltap.

1. Tilsett 5 µL av IEC-DNA til hver prøve i DNA-lyse-/ekstraksjonsbuffer for eluering i 50 µL. For eluering i forskjellige volumer, juster volumet av IEC-DNA deretter.
2. Fullfør DNA-ekstraksjonen i henhold til produsentens anbefalte protokoller.

PCR-DETEKSJONSPROTOKOLL

1. Klargjør en PCR-premiks i henhold til tabell 3. Sørg for at *Cand* ID- og *Cand* ID PLUS-premiksene tilberedes separat.

Volumene er oppgitt per reaksjonsbrønn og skal multipliseres med antall reaksjonsbrønner som kreves, inkludert tilstrekkelige reaksjoner for positive og negative kontroller. Den forberedte PCR-premiksen bør blandes grundig og sentrifugeres kort.

Komponent	Volum/reaksjon
qPCR Master Mix	10 µL
Cand-ID / *Cand*-ID PLUS Primer/Probe-blanding	2 µL
RNase/DNase-fritt vann	2 µL
Sluttvolum	14 µL

Tabell 3. *Cand*-ID / *Cand*-ID PLUS-analysepremiks (volumer per reaksjon).
På grunn av små variasjoner i pipetteringsnøyaktigheten anbefaler vi at du beregner ytterligere 10 % for sluttvolumet. Dvs. hvis du analyserer ti prøver, lag tilstrekkelig reaksjonsblanding til 11 tester.

2. Pipetter 14 µL av den forberedte PCR-premiksen i hver reaksjonsbrønn i henhold til oppsettet av den eksperimentelle qPCR-platen.
3. Forbered DNA-maler for hver av prøvene dine (se DNA-ekstraksjonstrinn).
4. Pipetter 6 µL DNA-mal i hver brønn i henhold til oppsettet på den eksperimentelle platen.
5. Bruk 6 µL RNase/DNase-fritt vann for negative kontrollbrønner. For positiv kontroll, bruk 6 µL *Cand* ID/ *Cand* ID PLUSS positiv kontroll, etter behov. Det endelige volumet i hver brønn er 20 µL.

Sørg for at PCR-reaksjonsplaten er forseglet og sentrifugert kort før du overfører den til en validert termosykler for amplifisering.

AMPLIFIKASJONSPROTOKOLL

1. Hvis du bruker et instrument som bruker ROX som passiv referanse, må den passive referansen slås av eller settes til «ingen» for ingen passiv referanse, ettersom IEC bruker ROX-kanalen.
2. Se instrumenthåndboken for instruksjoner om hvordan du konfigurerer en forsterkningskjøring. Amplifikasjon bør utføres i henhold til betingelsene beskrevet i tabell 4.

	Skritt	Tid	Temp
	Enzymaktivering	2 minutter	95 °C
Sykling x40	Denaturering	5 sekunder	95 °C
	Datainnsamling*	20 sekunder	60 °C

** Fluorogene data bør samles inn i dette trinnet gjennom FAM-, HEX-, ROX-og Cy5-kanalene*
Tabell 4. PCR-protokoll

TOLKNING AV RESULTATER

Se bruksanvisningen til termosykleren for informasjon om hvordan du bruker qPCR-instrumentet og utfører dataanalyse. Både *Cand*-ID og *Cand*-ID PLUS-analyser opererer i FAM-, HEX-, ROX- og Cy5-kanalene. Derfor er det nødvendig med riktig merking av brønnene på reaksjonsplaten. Husk å bruke fargekompensasjon hvis det er passende for qPCR-instrumentet ditt.

Det er viktig å inspisere amplifiseringsplottene visuelt for hver prøve for å sikre at resultatene som registreres skyldes ekte amplifisering og ikke kan tilskrives bakgrunnsstøy registrert over de definerte terskelverdiene.

Merk: Cq-estimatene angitt nedenfor er beregnet med terskelen plassert i midten av det loglineære området til PCR-amplifiseringskurven.

POSITIV KONTROLL

De medfølgende positive kontrollene skal hver registrere karakteristiske amplifiseringsplott gjennom FAM-, HEX- og Cy5-kanalene, med Cq på 28 ± 2. Det finnes ingen intern kontrollmal i den positive kontrollen, så ROX-kanalen skal ikke registrere noe signal (flate amplifiseringsplott). Hver positiv kontroll genererer signal som indikerer at analysen fungerer som den skal for deteksjon av tre *Candida*-målarter.

INGEN MALKONTROLL (NTC)

NTC-en skal gi en flat linje (flate amplifiseringsplott) gjennom alle kanaler. Signaler i NTC kan indikere krysskontaminering under plateoppsettet.

EKSEMPELDATA (OPPSUMMET I TABELL 5 OG 6)

1. Vellykket prøveekstraksjon indikeres av et positivt signal i ROX-kanalen (Cq> 25), med lavere Cq-verdier som indikerer mer effektiv ekstraksjon.
2. Tilstedeværelse av et signal i FAM/HEX/Cy5-kanalen indikerer at prøven inneholder *C. albicans* / *glabrata/parapsilosis* (f.eks. *Cand*-ID), og *C. tropicalis/krusei/dubliniensis* (for *Cand*-ID PLUSS), henholdsvis. Tilstedeværelse av signal i mer enn én av disse kanalene indikerer en blandet infeksjon (blandede *Candida*-arter).
3. Det er mulig å få et signal i FAM/HEX/Cy5-kanalen uten også å ta opp et signal i ROX-kanalen. Vanligvis skjer dette når en høy målmengde resulterer i tidlig amplifisering (dvs. lave Cq-verdier) og akkumuleringen av mål-DNA hemmer amplifiseringen av IEC-DNA.
4. Hvis det ikke er noe signal i noen av kanalene, har analysen mislyktes, og ingen konklusjoner er mulige.

				***Cand*-ID deteksjonskanaler**
FAM	**HEKSAKT**	**Cy5**	**ROX**	**Resultat**
+	-	-	+	***C. albicans* POSITIV prøve. IEC-BESTÅTT. Gyldig resultat.**
-	+	-	+	***C. glabrata* POSITIV prøve. IEC-BESTÅTT. Gyldig resultat.**
-	-	+	+	***C. parapsilosis* POSITIV prøve. IEC-BESTÅTT. Gyldig resultat.**
-	-	-	-	**Ugyldig resultat.**

Tabell 5. Sammendrag av datatolkning: *Cand* ID

				***Cand*-ID PLUSS: deteksjonskanaler**
FAM	**HEKSAKT**	**Cy5**	**ROX**	**Resultat**
+	-	-	+	***C. tropicalis* POSITIV prøve. IEC-BESTÅTT. Gyldig resultat.**
-	+	-	+	***C. krusei* POSITIV prøve. IEC-BESTÅTT. Gyldig resultat.**
-	-	+	+	***C. dubliniensis* POSITIV prøve. IEC-BESTÅTT. Gyldig resultat.**
-	-	-	-	**Ugyldig resultat.**

Tabell 6. Sammendrag av datatolkning: *Cand* ID PLUS

REFERANSER

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. Bougnoux ME *et al*. Intensive Care Med 2008;34(2): 292-9.
12. Alexander BD *et al*. Clin Infect Dis 2014;58(5): 754.

INTERNASJONAL SYMBOLBRUK

	Produsent
	Utløpsdato
	Se bruksanvisningen
	Lot-nummer
	Produktreferansenummer
	In vitro-diagnostikk
	Irriterende
	EU-autorisert representant

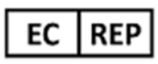
PRODUSENTINFORMASJON

For ytterligere informasjon, kan du kontakte



IMMY, Inc.

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

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

© 2026 IMMY. Alle rettigheter forbeholdt.