IMMY

CE IVD

*Cand*ID

REF.: OLM2007

Kit de qPCR para la detección de especies de *Candida* clínicamente relevantes – 50 pruebas

INTRODUCCIÓN

Cada año, las infecciones fúngicas son responsables de alrededor de 1,4 millones de muertes en todo el mundo (1). A pesar de ello, las infecciones fúngicas suelen ser malinterpretadas y reciben menos atención pública en comparación con las enfermedades causadas por bacterias, virus y parásitos. Las personas con sistemas inmunitarios debilitados, como los pacientes con cáncer y VIH, o aquellos que se han sometido a trasplantes de médula ósea u órganos, son los que corren mayor riesgo de sufrir una infección fúngica invasiva (2). Los patógenos fúngicos que representan el mayor riesgo son *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* y *Cryptococcus spp.* (3). Las infecciones por Candida ocupan el cuarto lugar entre las infecciones del torrente sanguíneo más frecuentes (4). Los pacientes que desarrollan septicemia causada por *Candida* tienen solo un 60 % de probabilidad de sobrevivir, a pesar del uso de medicamentos antifúngicos (5-11). Las especies de *Candida* presentan una resistencia cada vez mayor a los antifúngicos de primera y segunda línea (12). Las pocas opciones de tratamiento disponibles son costosas y pueden resultar tóxicas para pacientes que ya están enfermos.

*Cand*ID es un kit que contiene 2 pruebas de qPCR multiplex, cada una de las cuales detecta 3 especies de *Candida* comúnmente aisladas; *Cand*ID detecta *C. albicans, C. glabrata* y *C. parapsilosis,* mientras que *Cand*ID PLUS detecta *C. tropicalis, C. krusei* y *C. dubliniensis.* El kit *Cand*ID está diseñado para usarse como ayuda en la evaluación de pacientes con sospecha de infección por Candida.

CONTENIDO DEL KIT

- Mezcla de cebadores/sondas *CandID* (50 REACCIONES). (TAPÓN ROJO)
  Etiquetados como FAM, HEX, Cy5 y ROX (ver tabla a continuación)

Diana	Fluoróforo	Absorción (nm)	Emisión (nm)
C. albicans	FAM	494	518
C. glabrata	HEX	535	556
C. parapsilosis	Cy5	646	669
Control de extracción interna	ROX	575	602

Tabla 1. Contenido de la mezcla de cebadores y sondas y características de los colorantes fluorescentes

- Control positivo *Cand*ID (*C. albicans/glabrata/parapsilosis*). (**TAPÓN ROJO**)
- ADN de control interno de extracción (IEC). (**TAPÓN BLANCO**)
- Mezcla maestra para qPCR. (**TAPÓN BLANCO**)
- Agua libre de RNasa/DNasa. (**TAPÓN BLANCO**)
- Mezcla de cebadores/sondas *Cand*ID PLUS (50 reacciones). (**TAPÓN AZUL**)
  Etiquetados como FAM, HEX, Cy5 y ROX (ver tabla a continuación)

Diana	Fluoróforo	Absorción (nm)	Emisión (nm)
C. tropicalis	FAM	494	518
C. krusei	HEX	535	556
C. dubliniensis	Cy5	646	669
Control de extracción interna	ROX	575	602

Tabla 2. Contenido de la mezcla de cebadores/sondas *CandID* PLUS y características de los colorantes fluorescentes

- Control positivo *CandID* PLUS (*C. tropicalis* / *C. krusei* / *C. dubliniensis*). (**TAPÓN AZUL**)

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Instrumento de qPCR
- Pipetas y puntas
- Vórtex y centrífuga
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml
- Placa de qPCR y sellos para placas
- Kit de extracción de ADN

ALMACENAMIENTO DE LOS KITS

El kit *Cand*ID de IMMY debe almacenarse a -20 °C, donde se mantiene estable durante 18 meses a partir de la fecha de fabricación. Los componentes deben mantenerse a 0 °C, no deben exponerse a temperaturas superiores a -20 °C durante más de 30 minutos seguidos y deben evitarse los ciclos innecesarios de congelación y descongelación repetidos. Téngase en cuenta que la exposición a la luz provoca el fotoblanqueo de los fluoróforos y, por tanto, reduce la sensibilidad del ensayo. IMMY no recomienda utilizar el kit después de la fecha de caducidad indicada en el envase.

MATERIAL DE MUESTRA ADECUADO

El ADN debe extraerse de un cultivo o de una muestra clínica adecuada. Las buenas prácticas de laboratorio recomiendan incluir al menos un control de extracción positivo y uno negativo por análisis. Las muestras extraídas deben almacenarse entre -80 °C y -20 °C para su conservación a largo plazo. Tenga en cuenta que las bajas concentraciones de ADN pueden ser inestables si se almacenan durante períodos prolongados. Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas. El kit *Cand*ID de IMMY se puede utilizar con cualquier muestra preparada mediante un método de extracción de ácidos nucleicos compatible con la amplificación por PCR. Asegúrese de que las muestras sean adecuadas en términos de pureza, concentración e integridad del ADN. Siempre incluya al menos un control negativo (sin molde) con las muestras. Para preparar un control negativo, sustituya la muestra de ADN molde por agua libre de RNasa y DNasa.

RANGO DINÁMICO DE LA PRUEBA

En condiciones óptimas de PCR, los cebadores de los kits *Cand*ID de IMMY presentan eficiencias de amplificación superiores al 95 %. La prueba tiene un amplio rango dinámico de al menos seis órdenes de magnitud y es sensible a menos de un genoma *de Candida*.

ANÁLISIS DE RIESGOS

La fabricación del kit de qPCR *Cand*ID no incluye ninguna sustancia peligrosa. Los reactivos del kit no presentan ningún riesgo específico conocido para el usuario. Para los procedimientos descritos en este manual, es posible que se requieran productos químicos y materiales adicionales. IMMY recomienda leer atentamente todas las advertencias, instrucciones y fichas de datos de seguridad proporcionadas por el proveedor. Deben seguirse las normas generales de seguridad al manipular productos químicos, agentes biológicos peligrosos y otros materiales.

PRECAUCIONES GENERALES

- El kit de qPCR *Cand*ID es para uso diagnóstico in vitro.
- El procedimiento de prueba debe realizarse tal como se describe en las instrucciones de uso proporcionadas. Cualquier desviación de los protocolos establecidos puede provocar un fallo en el ensayo o la obtención de resultados erróneos.
- Al manipular las muestras, se deben seguir las precauciones estándar y las directrices del laboratorio o la institución local.
- Las bajas concentraciones de ADN pueden ser inestables si se almacenan durante largos períodos. IMMY recomienda minimizar el tiempo de almacenamiento de las muestras antes de realizar las pruebas.
- No mezcle reactivos de diferentes kits.
- Debe prepararse una premezcla de PCR independiente para cada uno de los ensayos triplex (*Cand*ID y *Cand*ID PLUS).
- No mezcle los dos reactivos de cebadores y sondas suministrados en este kit.
- Asegúrese de utilizar el control positivo adecuado con su ensayo correspondiente (los tubos están codificados por colores).
- No cargue las dos premezclas diferentes en el mismo pocillo de reacción de la placa de PCR.
- Dado que ambos ensayos (*CandID* y *CandID* PLUS) utilizan los mismos canales de fluorescencia, asegúrese de etiquetar adecuadamente los pocillos de la placa de reacción para diferenciar las dianas correspondientes a cada ensayo.
- No sustituya los reactivos por otros de diferentes fabricantes.
- Evite la contaminación de los reactivos siguiendo las buenas prácticas de laboratorio y separando el flujo de trabajo según corresponda.
- Asegúrese de que todos los consumibles adicionales necesarios estén libres de RNasa/DNasa.
- Utilice ropa protectora y guantes desechables al realizar la prueba.
- Utilice puntas de filtro desechables para todas las operaciones de pipeteo.
- Descongele las muestras de ADN en hielo y manténgalas en hielo.
- Asegúrese siempre de que los reactivos *Cand*ID se descongelen completamente, se mezclen, se centrifuguen y se mantengan en hielo.
- No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

- Los resultados positivos no excluyen la presencia de coinfección por otros microorganismos.
- La eficacia de la extracción puede influir negativamente en los resultados de la prueba *Cand*ID. IMMY recomienda utilizar el control interno de extracción suministrado en todas las extracciones de muestras para supervisar la eficacia de la extracción.

PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

PCR EN TIEMPO REAL

Los cebadores y las sondas diseñados individualmente para la detección de seis especies de *Candida* clínicamente relevantes (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. dubliniensis*) se han combinado en dos ensayos cuádruplex independientes, y su ADN puede detectarse a través de los distintos canales de fluorescencia descritos en el contenido del kit.

El sistema *Cand*ID de IMMY utiliza la química de qPCR más ampliamente empleada, basada en la detección de la luz emitida por las sondas de hidrólisis (Figura 1).

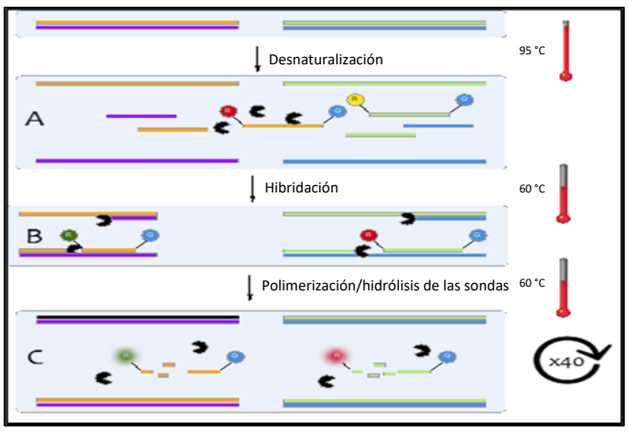


Figura 1. Principio de la prueba basada en sondas de hidrólisis. A. El ADN genómico bicatenario, representado por las hebras naranja y morada, se desnaturaliza al calentar brevemente la muestra a 95 °C. Cuando se añade antes de la extracción del ADN, el ensayo incluye también un control interno de extracción, representado por las hebras azul y verde. **B.** Durante la fase de hibridación de la PCR, la temperatura se reduce y los cebadores directo e inverso (líneas cortas de colores) se hibridan con cualquier ADN diana complementario presente. La misma mezcla de reacción contiene también sondas fluorogénicas, que consisten en oligonucleótidos de ADN específicos para la diana marcados con un fluoróforo indicador en el extremo 5' (R) y un apagador de fluorescencia (Q). En el caso del kit *Cand*ID de IMMY, estas sondas son específicas para (i) *C. albicans* (FAM), *C. glabrata* (HEX), *C. parapsilosis* (Cy5) y el control de extracción interno (ROX), utilizando la premezcla *Cand*ID (tapón ROJO) y (ii) *C. tropicalis* (FAM), *C. krusei* (HEX), *C. dubliniensis* (Cy5) y el control de extracción interno (ROX), utilizando la premezcla *Cand*ID PLUS (tapón AZUL). **C.** Durante la fase de polimerización de la PCR, las sondas hibridadas unidas a la diana son desplazadas y escindidas por la actividad nucleasa 5' de la polimerasa *Taq* (círculos negros), lo que da lugar a la separación física de los fluoróforos indicadores y los apagadores de fluorescencia. Esto da como resultado la emisión de luz a una longitud de onda específica del fluoróforo (véanse las tablas 1 y 2), que puede detectarse en los canales apropiados de un instrumento de qPCR.

CONTROL POSITIVO

El kit contiene 2 viales de control positivo, cada uno con un molde que especifica tres especies de *Candida* como dianas, correspondientes a las dianas de los ensayos *Cand*ID y *Cand*ID PLUS. El control positivo se trata como un extracto de ácido nucleico normal e indica que los cebadores y las sondas para detectar especies de *Candida* están funcionando correctamente durante la ejecución de la prueba. La inclusión del control positivo depende de la preferencia del usuario final y no es obligatoria en cada ejecución. Sin embargo, IMMY recomienda su uso en cada análisis, ya que proporciona mayor confianza en los resultados si todas las muestras son negativas. El control positivo no necesita someterse a un procedimiento de extracción de ácidos nucleicos. Se deben tomar precauciones para evitar la contaminación cruzada de otras muestras al agregar el control positivo a la ejecución. Cualquier riesgo puede minimizarse sellando todas las demás muestras y controles negativos antes de pipetear el control positivo en el pocillo de control positivo.

CONTROL SIN MOLDE (NTC)

Para confirmar la ausencia de contaminación, se debe incluir al menos una reacción de control sin molde (NTC) en cada ejecución de PCR. Para esta reacción, se debe utilizar agua libre de RNasa/DNasa en lugar del molde.

CONTROL INTERNO DE EXTRACCIÓN (IEC)

El control interno de extracción (IEC) se añade para distinguir las muestras verdaderamente negativas de las muestras falsamente negativas, que pueden ser consecuencia de la degradación de los ácidos nucleicos, de un fallo en la etapa de extracción de ácidos nucleicos, de la inhibición de la PCR o del mal funcionamiento del instrumento de qPCR. Los cebadores y la sonda necesarios para la detección del IEC están incluidos en la mezcla multiplex de cebadores y sondas. El molde IEC se añade al tampón de lisis/extracción de ADN o a la muestra una vez que se ha resuspendido en el tampón de lisis. La IEC proporcionará un valor de ciclo de cuantificación (Cq) superior a 25, cuya variación dependerá de la eficiencia de la extracción de la muestra y del nivel de dilución de la misma.

PROTOCOLO DE PRUEBA

Retire el kit *Cand*ID del congelador y deje que los reactivos se descongelen. Los reactivos descongelados deben mantenerse en hielo. Agite brevemente en un vórtex y centrifugue todos los tubos de reactivos *Cand*ID antes de usarlos.

EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN IEC se puede añadir tanto al tampón de lisis/extracción de ADN como a la muestra una vez que se haya resuspendido en el tampón de lisis.
NO agregue el ADN de control de extracción interno directamente a la muestra biológica sin procesar, ya que esto provocará su degradación y la pérdida de la señal.

1. Agregue 5 µl de ADN IEC a cada muestra en el tampón de lisis/extracción de ADN para su elución en 50 µl. Para la elución en diferentes volúmenes, ajuste el volumen del ADN IEC según proceda.
2. Realice la extracción de ADN siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante.

PROTOCOLO DE DETECCIÓN POR PCR

1. Prepare una premezcla para PCR según la tabla 3. Asegúrese de preparar por separado las premezclas *Cand*ID y *Cand*ID PLUS.

Los volúmenes se indican por pocillo de reacción y deben multiplicarse por el número de pocillos de reacción necesarios, incluyendo suficientes reacciones para los controles positivos y negativos. La premezcla de PCR preparada debe mezclarse completamente y centrifugarse brevemente.

Componente	Volumen/reacción
Mezcla maestra para qPCR	10 µl
Mezcla de cebadores y sondas *Cand*ID / *Cand*ID PLUS	2 µl
Agua libre de RNasa/DNasa	2 µl
Volumen final	14 µl

Tabla 3. Premezcla de ensayo *Cand*ID / *Cand*ID PLUS (volúmenes por reacción). *Debido a pequeñas variaciones en la precisión del pipeteo, recomendamos añadir un 10 % al volumen final; es decir, si va a analizar diez muestras, prepare suficiente mezcla de reacción para once pruebas.*

2. Pipetee 14 µl de la premezcla de PCR preparada en cada pocillo de reacción, de acuerdo con la configuración de su placa experimental de qPCR.
3. Prepare moldes de ADN de muestra para cada una de sus muestras (consulte el paso de extracción de ADN).
4. Pipetee 6 µl de molde de ADN en cada pocillo según la configuración de su placa experimental.
5. Para los pocillos de control negativo, utilice 6 µl de agua libre de RNasa/DNasa. Para el control positivo, utilice 6 µl de control positivo de *Cand*ID/*Cand*ID PLUS, según corresponda. El volumen final en cada pocillo es de 20 µl.

Asegúrese de que su placa de reacción de PCR esté sellada y centrifugada brevemente antes de transferirla a un termociclador validado para la amplificación.

PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN

1. Si se utiliza un instrumento que emplea ROX como referencia pasiva, esta deberá desactivarse o configurarse como «ninguna», ya que el IEC utiliza el canal ROX.
2. Consulte el manual de su instrumento para obtener instrucciones sobre cómo configurar una prueba de amplificación. La amplificación deberá realizarse de acuerdo con las condiciones detalladas en la tabla 4.

	Paso	Tiempo	Temperatura
	Activación enzimática	2 minutos	95 °C
Ciclado x40	Desnaturalización	5 segundos	95 °C
	Recopilación de datos*	20 segundos	60 °C

** Los datos fluorogénicos deben recopilarse durante este paso a través de los canales FAM, HEX, ROX y Cy5.*

Tabla 4. Protocolo de PCR

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Consulte el manual de instrucciones de su termociclador para obtener información sobre la utilización del instrumento de qPCR y para realizar el análisis de datos. Ambos ensayos *Cand*ID y *Cand*ID PLUS utilizan los canales FAM, HEX, ROX y Cy5. Por lo tanto, es necesario etiquetar adecuadamente los pocillos de la placa de reacción. Recuerde aplicar la compensación de color, si procede, a su instrumento de qPCR.

Es importante inspeccionar visualmente las gráficas de amplificación de cada muestra para garantizar que los resultados registrados se deban a una amplificación real y no puedan atribuirse al ruido de fondo registrado por encima de los umbrales definidos.

Nota: Las estimaciones de Cq indicadas a continuación se han calculado con el umbral situado en el centro de la región logarítmica lineal de la curva de amplificación de la PCR.

CONTROL POSITIVO

Los controles positivos suministrados deben registrar cada uno de los gráficos de amplificación característicos a través de los canales FAM, HEX y Cy5, con un Cq de 28 ± 2. No existe un molde de control interno dentro del control positivo, por lo que el canal ROX no debería registrar ninguna señal (gráficos de amplificación planos). Cada control positivo genera una señal que indica que el ensayo funciona correctamente para la detección de tres especies diana de *Candida*.

CONTROL SIN MOLDE (NTC)

El NTC debería proporcionar una línea plana (gráficos de amplificación planos) en todos los canales. Las señales en el NTC pueden indicar contaminación cruzada durante la preparación de la placa.

DATOS DE EJEMPLO (RESUMIDOS EN LAS TABLAS 5 Y 6)

1. La extracción exitosa de la muestra se indica mediante una señal positiva en el canal ROX (Cq > 25), mientras que los valores de Cq más bajos indican una extracción más eficiente.
2. La presencia de una señal en el canal FAM/HEX/Cy5 indica que la muestra contiene *C. albicans* / *glabrata/parapsilosis* (para *Cand*ID) y *C. tropicalis/krusei/dubliniensis* (para CandID PLUS), respectivamente. La presencia de señal en más de uno de estos canales indica una infección mixta (especies mixtas de *Candida*).
3. Es posible obtener una señal en el canal FAM/HEX/Cy5 sin registrar también una señal en el canal ROX. Normalmente, esto ocurre cuando una

carga diana elevada da lugar a una amplificación temprana (es decir, valores bajos de Cq) y la acumulación de ADN diana inhibe la amplificación del ADN del IEC.

4. Si no hay señal en ninguno de los canales, el ensayo ha fallado y no es posible llegar a ninguna conclusión.

				***Cand*ID: canales de detección**
FAM	**HEX**	**Cy5**	**ROX**	**Resultado**
+	-	-	+	**Muestra POSITIVA para *C. albicans*. IEC APTO. Resultado válido.**
-	+	-	+	**Muestra POSITIVA para *C. glabrata*. IEC APTO. Resultado válido.**
-	-	+	+	**Muestra POSITIVA para *C. parapsilosis*. IEC APTO. Resultado válido.**
-	-	-	-	**Resultado no válido.**

Tabla 5. Resumen de la interpretación de datos: *Cand*ID

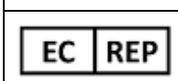
				***Cand*ID PLUS: canales de detección**
FAM	**HEX**	**Cy5**	**ROX**	**Resultado**
+	-	-	+	**Muestra POSITIVA para *C. tropicalis*. IEC APTO. Resultado válido.**
-	+	-	+	**Muestra POSITIVA para *C. krusei*. IEC APTO. Resultado válido.**
-	-	+	+	**Muestra POSITIVA para *C. dubliniensis*. IEC APTO. Resultado válido.**
-	-	-	-	**Resultado no válido.**

Tabla 6. Resumen de la interpretación de datos: *Cand*ID PLUS

REFERENCIAS

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. Guzmán 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.

USO DE SÍMBOLOS INTERNACIONALES

	Fabricante
	Fecha de caducidad
	Consultar las instrucciones de uso
	Número de lote
	Número de referencia del producto
	Diagnóstico in vitro
	Irritante
	Representante autorizado de la UE

INFORMACIÓN DEL FABRICANTE

Para obtener más información, contacte con:



IMMY, Inc.

2701 Corporate Centre Dr.
Norman, OK 73069 EE. UU.
+1 (405) 360-4669 / (800) 654-3639
Fax: +1 (405) 364-1058
Correo electrónico: info@immy.com
www.immy.com



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

© 2026 IMMY. Todos los derechos reservados.