



## ***AurisID***

Equipo qPCR para la detección de *Candida auris*

Referencia del Kit: OLM2010

50 pruebas



**Palex**  
Constant Improvement

# Introducción

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa en tiempo real (qPCR) se ha convertido en la tecnología molecular de aplicación de diagnósticos más extendida, diseñada para detectar y cuantificar patógenos.

*Candida auris*, una cepa del género *Candida*, es un patógeno con transmisión nosocomial y que presenta resistencias a múltiples fármacos. Desde que se aisló en 2009, *C. auris* se ha asociado a infecciones del torrente sanguíneo y de heridas a escala mundial, y ha causado brotes en hospitales en varios países. Normalmente posee resistencia al medicamento antifúngico de primera línea fluconazol, y se han detectado cepas resistentes a múltiples fármacos.

AurisID se enfoca a su uso en la identificación precisa de *Candida auris* mediante un cultivo fúngico y se ha diseñado, optimizado y verificado en estricto cumplimiento de las directivas de **MIQE** para el diseño de pruebas y presentación de informes de qPCR. Este kit proporciona reactivos para la amplificación de ADN de *C. auris*, así como el uso de qPCR en conjunto con química de detección con sonda de hidrólisis. AurisID detecta con rapidez *Candida auris* en 45 minutos desde la extracción de ácido nucleico.

# Contenido

- **Conjunto de cebador y sonda de *AurisID* (50 reacciones)**  
Etiquetados como FAM y ROX (ver tabla abajo)

Diana	Fluoróforo	Absorción (nm)	Emisión (nm)
<i>C. auris</i>	FAM	494	518
Control de extracción interna	ROX	575	602

**Tabla 1. Contenido del conjunto cebador/sonda y características de los tintes fluorescentes**

- **Control positivo de *AurisID* (ADN molde de *C. auris*)**
- **Control de extracción interna de ADN de OLM (IEC)**
- **Master mix de qPCR de OLM**
- **Agua libre de RNasas y DNasas de OLM**

## Equipo y reactivos no incluidos que el usuario deberá usar

**Equipo de extracción de ADN**  
**Instrumento de qPCR para tubos de microcentrifugado de 1,5 ml**  
**Pipetas y puntas**  
**Mezclador de vórtice y centrifugadora**  
**Placa para qPCR y selladores de placas**

## Almacenamiento

El equipo *AurisID* de OLM debería almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ , donde permanecerá estable durante 12 meses. Los componentes deberían mantenerse a  $0^{\circ}\text{C}$ , sin ser expuestos a una temperatura superior a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante más de 30 minutos cada vez y no es recomendable congelar y descongelar repetidamente. La exposición a la luz provoca el fotoblanqueamiento de los agentes fluorescentes y reduce la sensibilidad de la prueba.

OLM Diagnostics desaconseja usar el equipo tras la fecha de caducidad indicada en el paquete.

## Material de muestra adecuado

Se debería extraer ADN de cultivos o de muestras clínicas adecuadas. La buena praxis en laboratorios recomienda incluir al menos un control de extracción positivo y otro negativo por análisis. Las muestras extraídas deberían almacenarse entre  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  para poder conservarse a largo plazo. Las bajas concentraciones de ADN pueden ser inestables si se almacenan durante largos periodos de tiempo. Debería evitarse congelar y descongelar repetidamente. El equipo de *AurisID* de OLM se puede usar con cualquier muestra preparada mediante un método de extracción de ácido nucleico compatible con la amplificación por PCR. Asegúrese de que las muestras son apropiadas en cuanto a pureza, concentración e integridad del ADN. Realice siempre al menos un control negativo (sin plantilla) con las muestras. Para preparar un control negativo, reemplace la muestra de ADN con agua libre de RNasas y DNasas.

## Rango dinámico de la prueba

Bajo las condiciones óptimas para la PRC, los cebadores en los equipos de *AurisID* de OLM dan como resultado una eficiencia en la amplificación de más de un 90 %. La prueba posee un gran rango dinámico de al menos seis órdenes de magnitud y es sensible a menos de 10 copias de genoma de *Candida auris*

## Evaluación del riesgo

No hay sustancias peligrosas incluidas en la fabricación del equipo de qPCR *AurisID*. Los reactivos del equipo no presentan riesgos específicos al usuario. Puede que se requieran químicos y materiales adicionales para llevar a cabo los procedimientos indicados en este manual. OLM recomienda que se lea con cuidado las advertencias, instrucciones y hojas de datos de seguridad del material que el fabricante haya facilitado. Se deben seguir las normas de seguridad general al manipular materiales químicos, de riesgo biológico y demás.

## Precauciones generales

- El equipo de qPCR *AurisID* se usa para diagnósticos *in vitro*.
- El procedimiento de prueba deberá realizarse como se indica en las instrucciones de uso proporcionadas. Cualquier desvío del protocolo indicado podría resultar en un fallo de la prueba o podría generar resultados erróneos.
- Deben seguirse las precauciones y directrices estándares del laboratorio o institución al tratar con muestras.
- Las bajas concentraciones de ADN pueden ser inestables si se almacenan durante largos periodos de tiempo. OLM recomienda que los tiempos de almacenamiento de muestras deberían minimizarse antes de realizar pruebas.
- No se deben mezclar reactivos de equipos diferentes.
- No se deben sustituir reactivos con los de otros fabricantes.

- Evite la contaminación de reactivos siguiendo una buena praxis de laboratorio y segregando el proceso de trabajo según proceda.
- Asegúrese de que los consumibles adicionales necesarios estén libres de RNasas y de DNasas.
- Lleve ropa protectora y deseche los guantes al realizar la prueba.
- Use puntas desechables para todas las pipetas.
- Descongele las muestras de ADN en hielo y manténgalas en él.
- Asegúrese siempre de que los reactivos de *AurisID* están bien descongelados, mezclados, centrifugados y metidos en hielo.
- No use reactivos tras su fecha de caducidad.

## Limitaciones de la prueba

- Los resultados positivos no descartan una coinfección con otros organismos.
- La eficiencia en la extracción puede tener un impacto negativo en los resultados de la prueba con *AurisID*. OLM Diagnostics recomienda que el control de extracción interna que se proporciona se use en todas las extracciones de pruebas para comprobarlo.

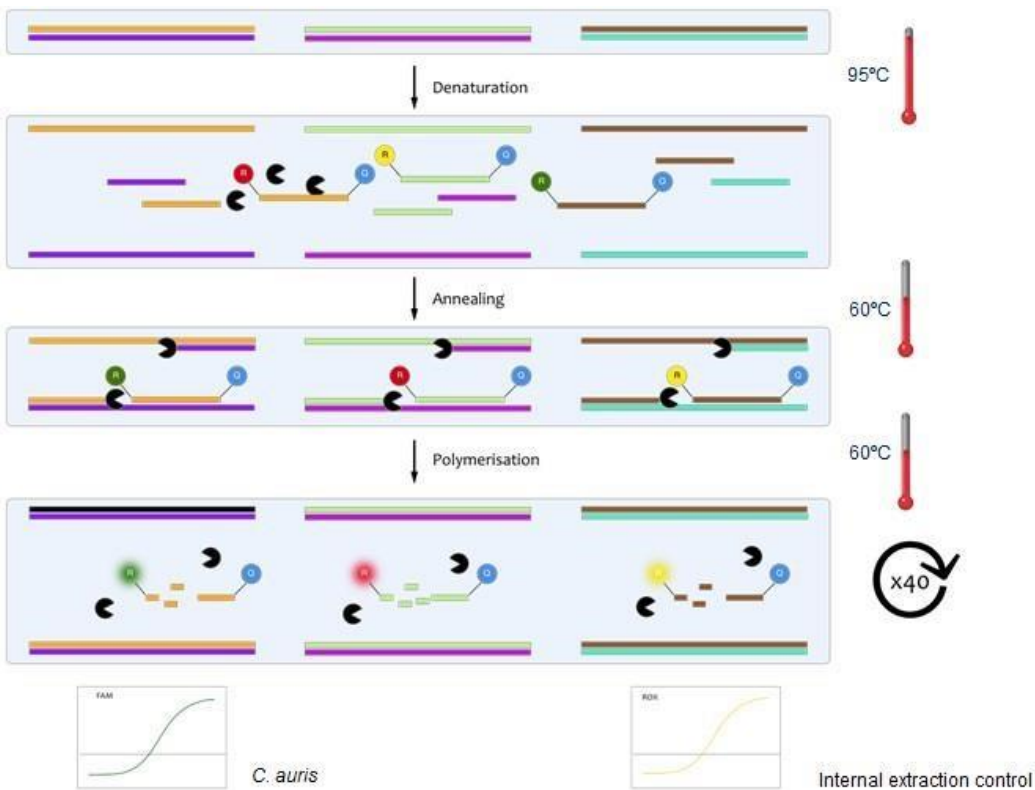
## Principios de la prueba

### PCR en tiempo real

El cebador individual y diseños de sonda para la detección de *Candida auris*, y una plantilla de control de extracción interna sintética (introducida en la etapa de extracción de muestras) se han combinado en una sola prueba y el ADN se puede detectar mediante los distintos canales fluorescentes como se describe en la sección de contenidos.

*AurisID* de OLM usa la química de qPCR más extendida, basada en la detección

de luz emitida por muestras de hidrólisis (Imagen 1).



**Imagen 1. Principio de prueba basada en sondas de hidrólisis.** El ADN genómico de cadena doble, representado por las tiras de colores, se desnatura cuando la muestra se calienta brevemente a 95° C. Durante la fase de templado de la PCR la temperatura se reduce, y los cebadores directos e inversos (líneas cortas coloreadas) se fusionan con cualquier secuencia de ADN complementaria presente. La misma mezcla de reacción contiene también sondas fluorogénicas, que consisten en oligonucleótidos de ADN específicos con un tinte «reporter» fluorescente de 5' (R) y un «quencher» (Q). En el equipo *AurisID* de OLM, estas sondas son específicas para *C. auris* (FAM) y el control de extracción interna (ROX). Durante la fase de polimerización de la PCR, las sondas enlazadas quedan escindidas por la actividad de la nucleasa 5' de la polimerasa *Taq* (círculos negros), dando como resultado la separación física de los «reporters» y de los «quenchers». Esto provoca la emisión de luz en longitudes de onda específicas de los fluoróforos (Tabla 1), la cual se puede detectar en los canales apropiados de un instrumento de qPCR.

## **Control positivo**

El equipo contiene un tubo de control positivo con molde para la diana (*C. auris*). El control positivo se porta como un extracto de ácido nucleico normal e indica que los cebadores y sondas para detectar *C. auris* trabajan correctamente en el momento. El incluir el control positivo depende de las preferencias del usuario final y no es obligatorio llevarlo a cabo en cada prueba. Sin embargo, OLM recomienda que se haga cada vez dado que aumenta la confianza en los resultados si todas las muestras son negativas. El control positivo no tiene que ser sujeto de un procedimiento de extracción de ácido nucleico. Se debe proceder con cuidado para evitar la contaminación cruzada de otras muestras al añadir el control positivo a la prueba. Cualquier riesgo puede minimizarse sellando el resto de muestras y controles negativos antes de usar la pipeta para colocar el control positivo en el depósito.

## **Control sin plantilla (NTC)**

Para confirmar que no haya contaminación, debe incluirse al menos una reacción a un control sin plantilla (NTC) en cada prueba de PCR. Para esta reacción debe usarse agua libre de RNAsas y DNAasas en vez de ADN molde.

## **Control de extracción interna (IEC)**

El control de extracción interna (IEC) se añade para distinguir las muestras verdaderamente negativas de aquellas con falso negativo, que pueden ser resultado de una degradación del ácido



nucleico, un fallo en un paso de la extracción de ácido nucleico, la inhibición de PCR o fallo de un instrumento de qPCR. Los cebadores y sondas necesarios para detectar el IEC se incluyen en el conjunto de cebador y sonda de *AurisID*. El IEC dará un valor de ciclo de cuantificación (Cq) de más de 25, y variará dependiendo de la eficiencia de la extracción de muestras y del nivel de dilución de la muestra.

## Protocolo de pruebas

Saque el equipo de *AurisID* del congelador y deje que los reactivos se descongelen. Los reactivos descongelados deben permanecer metidos en hielo. Mezcle y centrifugue brevemente todos los tubos de reactivos de *AurisID* antes de su uso.

## Extracción de ADN

El ADN de IEC se puede añadir o bien al tampón de lisis o extracción del ADN o bien a la muestra una vez se haya resuspendido en el tampón de lisis.

**NO añada el ADN de control de extracción interna directamente a la muestra biológica sin procesar dado que esto conllevará su degradación y una pérdida de señal.**

1. Añada 5 µl del ADN de control de extracción interna de OLM (IEC) a cada muestra en el tampón de lisis o extracción de ADN para un volumen de elución de 50 µl. Para eluir diferentes volúmenes, ajuste el volumen del ADN del IEC como corresponda.
2. Complete la extracción de ADN de acuerdo con el protocolo recomendado del fabricante.

# Protocolo de detección de PCR

## 1. Prepare una premix de PCR de acuerdo con la Tabla 2

Los volúmenes vienen dados por reacción y deben multiplicarse por el número de reacciones necesario e incluir reacciones suficientes para los controles positivos y negativos. Las premix de PCR ya preparadas deberían mezclarse bien y centrifugarse brevemente.

Componente	Volumen/reacción
Master mix de qPCR de OLM	10 µl
Conjunto de cebador y sonda de <i>AurisID</i>	2 µl
Agua sin RNasa ni DNasa de OLM	2 µl
<b>Volumen final</b>	<b>14 µl</b>

Tabla 2. Premix de prueba de *AurisID* (volúmenes por reacción).

Debido a pequeñas variaciones en la precisión de las pipetas, recomendamos que prepare un 10 % extra en cuanto al volumen final como, por ejemplo, preparar premix suficiente para 11 pruebas si debe realizar 10.

- Use la pipeta para depositar 14 µl de premix de PCR en cada depósito de reacción de acuerdo con la placa de experimentos de qPCR que esté usando.
- Prepare plantillas de prueba de ADN para cada uno de sus pruebas (vea el paso de extracción de ADN).
- Use la pipeta para depositar 6 µl de plantilla de ADN en cada depósito de acuerdo con la placa de experimentos que esté usando.

5. Para los depósitos de control negativo, use 6 µl de agua libre de ARNasa y ADNasa. Para el control positivo, use 6 µl de control positivo de *AurisID*. El volumen final de cada depósito es 20 µl.
6. Asegúrese de que su placa de reacción de PCR está sellada y centrifúguela brevemente antes de transferirla a un termociclador validado para la amplificación

## Protocolo de amplificación

Si usa un instrumento que hace uso de ROX como referencia pasiva, entonces debe apagar o desactivar la referencia pasiva, dado que el IEC usa el canal ROX.

Compruebe su manual de instrumento si necesita instrucciones sobre cómo configurar una prueba de amplificación. La amplificación debe realizarse de acuerdo con las condiciones detalladas en la Tabla 3.

	Paso	Tiempo	Temp.
	Activación de la enzima	2 min	95° C
Ciclo x 40	Desnaturalización	5 seg	95° C
	<b>OBTENCIÓN DE DATOS</b>	20 seg	60° C

\* Los datos fluorogénicos deberían obtenerse durante esta etapa mediante los canales FAM y ROX.

**Tabla 3. Protocolo de PCR**

## Interpretación de resultados

Compruebe el manual de instrucciones de su termociclador para más información sobre cómo operar el instrumento de qPCR y llevar a cabo análisis de datos.

**Es importante inspeccionar visualmente los gráficos de amplificación de cada muestra para asegurarse de que los resultados se deben a una correcta amplificación y no se pueden atribuir a que se haya grabado ruido de fondo que haya sobrepasado los límites definidos.**

Nota: Las estimaciones de Cq de más abajo se calculan con el límite establecido en el centro del rango linear-logarítmico de la curva de amplificación de PCR.

### **Control positivo**

El depósito de control positivo que se proporciona debería registrar, un gráfico de amplificación específico a través del canal FAM (*C. auris*), con un Cq de  $27 \pm 2$ . No hay plantilla de control interno en el control positivo así que el canal ROX no debería registrar ninguna señal (gráficos de amplificación planos). Las señales de control positivo indican que el equipo funciona correctamente detectando *C. auris*.

### **Control sin plantilla (NTC)**

EL NTC debería mostrar una línea plana (gráficos de amplificación planos) por los dos canales, FAM y ROX. Si hay alguna señal en el NTC significa que podría haber contaminación cruzada a la hora de montar la placa.

### **Datos de muestra**

1. Si se extraen muestras con éxito, esto se indicará con una señal positiva en el canal ROX (Cq mayor de 25), y cuanto menor sea el Cq, más eficiente habrá sido la extracción.
2. Si no hay señal en el canal FAM, significa que la muestra no contiene *Candida auris*.
3. Una señal en el canal FAM indica presencia de *C. auris*.

4. Es posible obtener una señal en el canal FAM sin que se registre una señal en el canal ROX.  
Normalmente esto ocurre cuando una carga fúngica elevada resulta en una amplificación temprana (por ejemplo, Cq bajos) y la acumulación de ADN objetivo inhibe la amplificación de ADN de IEC.  
Este resultado sigue siendo válido.
5. Si no hay señal en ningún canal, la prueba ha fallado y no es posible extraer conclusiones.

<b>AurisID: canales de detección</b>		
<b>FAM</b>	<b>ROX</b>	<b>Resultado</b>
+	+	<i>Muestra POSITIVA en C. auris IEC SUPERADO</i> <b>Resultado válido</b>
-	+	<i>Muestra NEGATIVA en C. auris IEC SUPERADO</i> <b>Resultado válido</b>
+	-	<i>Muestra POSITIVA en C. auris IEC no posible por carga elevada de ADN objetivo de C. auris</i> <b>Resultado válido</b>
-	-	Resultado no válido.

**Tabla 4. Resumen de la interpretación de datos**



© 2018 OLM Diagnostics. Todos los derechos reservados.

**Palex**  
Constant Improvement