

# **Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD**

## **Kit de PCR en tiempo real para Candida albicans, IVD**

**REF** MD04891, 96 reacciones

*Solo para uso diagnóstico in vitro profesional*



**ES**

**Instrucciones de Uso**

**MD0489\_IM\_es**

**VERSIÓN 2401, enero 2024**



## Contenido

1. Introducción .....	3
2. Uso previsto .....	3
3. Principios de la prueba.....	3
4. Composición del kit.....	3
5. Condiciones de almacenamiento, estabilidad y manipulación.....	4
6. Materiales e instrumentación necesarios pero no proporcionados.....	4
7. Recolección y preparación de muestras .....	4
8. Precauciones y Advertencias .....	4
8.1. Información de seguridad .....	4
8.2. Requisitos de manipulación y procedimiento.....	4
9. Procedimiento de prueba .....	5
9.1. Configuración de la reacción.....	5
9.2. Programación del instrumento de PCR en tiempo real .....	5
10. Análisis de los datos .....	6
10.1. Ejecutar criterios de validación.....	6
10.2. Interpretación de los resultados de la prueba.....	6
11. Evaluación del desempeño .....	7
11.1. Resultados previstos .....	7
11.2. Límite de detección (LoD) - Sensibilidad analítica .....	7
11.3. Reactividad analítica (inclusividad) y especificidad analítica .....	7
11.4. Precisión .....	9
11.4.1. Repetibilidad .....	9
11.4.2. Reproducibilidad diaria .....	9
11.4.3. Reproducibilidad lote a lote .....	9
11.4.4. Reproducibilidad entre operadores.....	9
11.4.5. Reproducibilidad entre instrumentos.....	9
11.5. Evaluación clínica .....	10
12. Control de calidad .....	10
13. Apoyo técnico .....	10
14. Marcas registradas y descargos de responsabilidad.....	10
15. Explicación de los símbolos.....	10
16. Declaración de conformidad.....	11
17. Referencias.....	12

## 1. Introducción

*Candida albicans* es un hongo unicelular diploide que coloniza naturalmente el tracto intestinal humano de  $\pm$  80% de la población. *C. albicans* es, sin embargo, una levadura oportunista que puede causar infecciones orales y genitales. La infección se acompaña de una transición morfológica de un organismo unicelular a una forma filamentos multicelular patógena. En la forma comensal, el hongo vive en el tracto gastrointestinal y su crecimiento está regulado por otros microorganismos, así como por el sistema inmune del hospedador. El cambio entre las formas comensal y patógena, conocido como cambio fenotípico, puede regularse mediante la expresión génica diferencial coordinada por varios factores de transcripción. En última instancia, el cambio fenotípico a la forma multicelular permite la penetración de la membrana mucosa a partir de la cual se inicia la infección. La infección por *C. albicans* provoca candidiasis, que puede ser superficial o sistémica cuando se convierte en una enfermedad potencialmente mortal. Las infecciones superficiales provocan síntomas como picazón e irritación, que generalmente pueden eliminarse con medicamentos antimicóticos. Sin embargo, las personas con un sistema inmune debilitado o con diabetes tienen un mayor riesgo de desarrollar una infección. Cuando se produce un crecimiento excesivo, puede provocar infecciones del tracto urinario, infecciones genitales por levaduras, aftas orales y aftas mucocutáneas. En los casos más graves, cuando *C. albicans* entra en el torrente sanguíneo o en los órganos, puede provocar pérdida de la visión, infecciones de la sangre y los huesos, endocarditis, meningitis o inflamación del revestimiento intraabdominal. La PCR en tiempo real es el método más rápido y fiable para realizar un diagnóstico preciso de infección por *C. albicans*.

## 2. Uso previsto

El Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, es una prueba molecular basada en la tecnología de PCR en tiempo real, destinada a la detección rápida y el diagnóstico cualitativo de ácidos nucleicos patógenos definidos en muestras biológicas humanas. El uso del kit está indicado en pacientes con síntomas inflamatorios del tracto vaginal, para el diagnóstico y control de la infección causada por *C. albicans*. La aplicación del kit no depende de aspectos poblacionales y demográficos. No hay contraindicaciones para usar el Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD. Sin embargo, esta prueba sirve como complemento al diagnóstico y su resultado debe combinarse con los signos y síntomas clínicos de la infección por hongos. Por lo tanto, un resultado positivo indica la presencia del ADN de *C. albicans*, pero la correlación clínica de la historia y otra información de diagnóstico es necesaria para determinar el estado de infección de la paciente. Un resultado negativo no excluye la existencia de *C. albicans* y no debe utilizarse como único instrumento para la decisión de tratamiento de la paciente. Las pruebas las deben realizar técnicos de laboratorio especializados y calificados, especialmente en técnica de PCR en tiempo real y diagnóstico molecular *in vitro*. Las muestras clínicas idóneas incluyen hisopos vaginales de células epiteliales. El kit solo debe usarse como se indica en este manual de usuario.

## 3. Principios de la prueba

El Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, proporciona el conjunto de reactivos, enzimas y oligonucleótidos (cebadores y sondas) para la detección cualitativa del genoma de *C. albicans*, utilizando la técnica de PCR en tiempo real (consulte los requisitos de especificación del equipo en la Sección 6). El kit detecta el gen RPR1 que se identificó previamente como un buen marcador genético para *C. albicans*. El Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, fue diseñado para tener un perfil de detección amplio, sin dejar de ser específico para el genoma de *C. albicans*. Los cebadores y las sondas del kit tienen un 100% de homología con el 100% de las secuencias de *C. albicans* disponibles en la base de datos GenBank (noviembre de 2022). Además, el conjunto de oligonucleótidos fue diseñado específicamente para la detección de este organismo y no muestra una homología significativa con otros genomas, lo que refleja la alta especificidad y sensibilidad de detección de la prueba. Como tal, el kit fue diseñado para ser específico para el genoma de *C. albicans* y para evitar la detección de otros organismos que causan infecciones vaginales. El control interno, incluido en el kit, valida la eficacia del proceso de extracción así como la ausencia de inhibidores de PCR potencialmente presentes en las muestras biológicas humanas. Periódicamente, NZYtech revisa la secuencia del gen diana de *C. albicans* y, si es necesario, lanzará una nueva versión de este kit. Además, el kit incluye dos controles externos (un control positivo y un control negativo) como se describe a continuación. El control positivo consta de fragmentos de ácido nucleico que contienen las dos secuencias dianas detectadas por el kit (gen fúngico RPR1 y el gen de la  $\beta$ -actina humana).

En este kit, la detección cualitativa de ADN se basa en la tecnología PCR en tiempo real, que es una metodología de referencia en el diagnóstico de laboratorio. Es una metodología de alta sensibilidad y especificidad para detectar con precisión la presencia de este organismo. El Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech se basa en el principio de investigar la presencia de ADN del hongo Candida, aislado y purificado con un sistema de extracción. El ADN extraído se somete a una amplificación por PCR, en una sola reacción, utilizando dos conjuntos de cebador/sonda altamente específicos aprovechando el principio TaqMan<sup>®</sup>. En la presencia del ADN de *C. albicans*, la sonda TaqMan<sup>®</sup> se une específicamente a las regiones conservadas del gen RPR1 que están flanqueadas por dos pares de cebadores específicos. Un segundo conjunto de cebadores/sonda actúa como control interno, detectando el gen de la  $\beta$ -actina humana (ACTB), lo que permite confirmar la eficiencia del proceso de captura del material biológico recogido del paciente. Además, este control interno demuestra que los inhibidores de la PCR potencialmente presentes en las muestras clínicas/ambientales no inhibieron la reacción. Para permitir la identificación de la amplificación de las dos dianas específicas en una sola reacción, las sondas específicas para *C. albicans* y para la  $\beta$ -actina humana se marcan con colorantes indicadores FAM<sup>™</sup> y HEX<sup>™</sup>, respectivamente. Por lo tanto, este kit consta de una prueba dúplex en el que la diana específica de *C. albicans* se detecta en el canal óptico FAM y el gen diana humano se detecta en el canal óptico HEX. Estos oligonucleótidos/conjuntos de sondas se proporcionan en concentraciones optimizadas para garantizar que el ADN humano, incluso cuando está presente en concentraciones extremadamente altas, no limite la eficacia de los conjuntos de cebadores/sonda de *C. albicans*.

## 4. Composición del kit

El Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, proporciona un conjunto completo de reactivos suficientes para realizar 96 reacciones de qPCR en un solo paso.

COMPONENTE DEL KIT		VOLUMEN (POR VIAL)	NÚMERO DE TUBOS
<b>C. albicans MMix</b>	Mezcla maestra de sonda NZYSupreme qPCR (2x)	1050 µL	1
<b>C. albicans PPMix</b>	<i>C. albicans</i> /cebadores ACTB/mezcla de sonda	205 µL	1
<b>C. albicans POS</b>	<i>C. albicans</i> /Control positivo ACTB	105 µL	1
<b>NTC</b>	Control sin plantilla	105 µL	1

## 5. Condiciones de almacenamiento, estabilidad y manipulación

El *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech se envía refrigerado. Al recibir el kit, todos los componentes deben almacenarse inmediatamente entre -85 °C y -15 °C. Cuando esté en uso, los componentes del kit deben colocarse rápidamente en el congelador después de su uso para minimizar el tiempo de exposición a temperatura ambiente. Además:

- Minimice el número de ciclos de congelación y descongelación almacenando alícuotas de trabajo. Si corresponde, los componentes del kit se pueden dividir en alícuotas en volúmenes más pequeños después de descongelarlos.
- El componente *C. albicans* PPMix debe almacenarse protegido de la luz. En particular, no exponga Mezcla maestra de sonda NZYSupreme qPCR (2x) a la luz solar directa después de combinarla con la mezcla de cebadores/sonda.
- Si el paquete que protege el kit llega dañado, comuníquese con NZYtech.
- Cuidado con la fecha de caducidad indicada en el envase. NZYtech no recomienda usar el kit después de la fecha de vencimiento. En esta fecha, el kit debe desecharse siguiendo las instrucciones de eliminación de la **Sección 8.2**.

## 6. Materiales e instrumentación necesarios pero no proporcionados

- Instrumento de PCR en tiempo real que detecta FAM™ y HEX™/JOE™/VIC™ (a longitudes de onda de emisión de 520 y 556 nm, respectivamente). Véase en la **Sección 11** los modelos de instrumentos para los que se validó el kit.
- Equipos y consumibles para el aislamiento de ADN de muestras biológicas/clínicas.
- Material de plástico de qPCR libre de ARNasa/ADNasa: Tubos de PCR de 1,5 ó 2 mL, tiras, tapas, placas de 96 pocillos, películas adhesivas.
- Pipetas y puntas con filtro (sin RNasa/DNasa).
- Guantes desechables.
- Vortex y centrífuga.

## 7. Recolección y preparación de muestras

El kit está diseñado para detectar ADN extraído de hisopos vaginales. Diferentes factores, como el procedimiento de recolección de muestras biológicas, el transporte, el almacenamiento y el tiempo de procesamiento de las muestras, son fundamentales para garantizar la integridad de las muestras y lograr resultados óptimos. Las muestras recolectadas deben analizarse lo antes posible. La recolección, la manipulación y/o el transporte inadecuado de las muestras pueden causar un resultado falso. Los ácidos nucleicos extraídos constituyen el material de partida para la prueba con el *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech. NZYtech recomienda el uso del kit de aislamiento NZY Plant/Fungi gDNA (MB177, NZYtech) para la extracción de ácidos nucleicos, ya que este kit ha sido validado para la extracción de muestras de *C. albicans*. Asegúrese de que las muestras de ADN sean idóneas en términos de pureza, concentración e integridad del ácido nucleico. Dado que el etanol es un fuerte inhibidor de la PCR en tiempo real, es necesario eliminar este componente antes de la elución de los ácidos nucleicos durante el proceso de extracción. El kit de NZYtech contiene un control interno que apunta al ADN humano copurificado con DNA de *C. albicans*. El ADN humano se amplifica con el conjunto de oligonucleótidos (cebadores y sonda) del gen de la  $\beta$ -actina humana. La introducción del control interno es útil para evaluar la eficacia de la extracción y el aislamiento del ADN y/o para detectar la presencia de posibles inhibidores durante el procesamiento de la muestra.

## 8. Precauciones y Advertencias

Como en cualquier procedimiento de prueba analítica, las buenas prácticas de laboratorio son esenciales. Siga cuidadosamente los procedimientos y las guías que se proporcionan en este manual para asegurarse de que la prueba se realice correctamente. Cualquier desviación de ellos puede resultar en una falla de la prueba o causar resultados erróneos. Debido a la alta sensibilidad del kit, se debe tener especial cuidado para mantener los reactivos y las mezclas de amplificación de PCR libres de contaminación.

### 8.1. Información de seguridad

Antes de usar el kit, consulte la Ficha de Datos de Seguridad (FDS) que está disponible en el sitio web de NZYtech ([www.nzytech.com](http://www.nzytech.com)). La detección de este kit la debe llevar a cabo únicamente el personal capacitado en los procedimientos técnicos y de seguridad pertinentes en laboratorios debidamente equipados. Se deben seguir las guías internacionales y nacionales sobre bioseguridad en el laboratorio en todas las circunstancias.

### 8.2. Requisitos de manipulación y procedimiento

- Solo para uso diagnóstico *in vitro* profesional
- No use este kit después de la fecha de vencimiento.
- No utilice los componentes de prueba si el sellado del kit está dañado.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes de producción.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes junto con los reactivos de este kit de prueba.
- En todos los procedimientos se deben utilizar pipetas y recipientes de plástico desechables libres de ADNasa/RNasa.

- La preparación de muestras, la configuración de la reacción y la amplificación deben realizarse en diferentes áreas de trabajo. El orden de las tareas en el laboratorio debe ser unidireccional. Siempre use guantes desechables en cada área y cámbielos antes de ingresar a una área diferente. Si es posible, cámbiate de abrigo.
- Seleccione materiales y equipos específicos para cada área de trabajo individual y no los transfiera de un área a otra.
- Las muestras biológicas deben manipularse como si fueran infecciosas siguiendo las precauciones de bioseguridad adecuadas.
- El control positivo contiene plantillas con un alto número de copias; debe abrirse y procesarse lejos de las muestras de prueba y los componentes del kit para evitar la contaminación cruzada.
- Utilice siempre el NTC proporcionado en el kit.
- Manipule las placas postamplificación con cuidado y elimínelas inmediatamente después del final de la prueba; las placas siempre deben desecharse en un contenedor de riesgo biológico adecuado después de su uso.
- Al final de cada prueba, limpie/desinfecte las superficies de las áreas de trabajo y el equipo con una solución desinfectante adecuada para eliminar cualquier rastro de ácidos nucleicos.
- Los residuos de productos químicos y preparados se consideran generalmente como residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada por leyes y reglamentos nacionales y regionales.
- Todos los resultados deben ser interpretados por un profesional de la salud en el contexto del historial médico y los síntomas clínicos del paciente.
- Esta prueba no puede excluir enfermedades causadas por otros patógenos.
- Un resultado negativo para cualquier prueba de PCR no descarta de manera concluyente la posibilidad de infección.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio, use ropa protectora, use permanentemente guantes desechables sin talco, use gafas de protección y mascarillas. No coma, beba ni fume en el área de trabajo.

## 9. Procedimiento de prueba

Lea atentamente las instrucciones de uso antes de realizar la prueba. Tenga en cuenta que los pasos de pipeteo y la configuración de la placa deben realizarse en enfriadores de mesa o hielo. Después del vertido en la placa, inicie inmediatamente el protocolo de PCR en tiempo real. La incubación prolongada de mezclas de reacción a temperatura ambiente puede provocar artefactos de PCR que reducen la sensibilidad de detección. Antes del experimento, mezcle suavemente los tubos de reacción provistos, centrifugue durante 5 segundos para recolectar el contenido en el fondo del tubo y coloque los tubos en hielo. **Recomendamos encarecidamente pipetear el *C. albicans* POS, el control positivo del kit, en último lugar para evitar contaminaciones cruzadas.**

### 9.1. Configuración de la reacción

1. Prepare una mezcla de qPCR suficiente para el número de pruebas que se van a realizar con un volumen adicional del 5% para las pérdidas por pipeteo. Proceda de acuerdo con la tabla a continuación que especifica los volúmenes para 1 y  $n$  pruebas (donde  $n$  corresponde al número total de reacciones):

COMPONENTE	1 PRUEBA VOLUMEN ( $\mu\text{L}$ )	$n$ PRUEBAS (*) VOLUMEN + 5% ( $\mu\text{L}$ )
<i>C. albicans</i> MMix	10	$n \times 10,5$
<i>C. albicans</i> PPMix	2	$n \times 2,1$
<b>Volumen Final</b>	<b>12</b>	<b><math>n \times 12,6</math></b>

(\*) Para calcular el número total de reacciones necesarias para cada prueba, cuente el número de muestras y agregue dos más para el control Negativo y Positivo, respectivamente.

2. Pipetee 12  $\mu\text{L}$  de la mezcla de qPCR en pocillos individuales de acuerdo con la configuración de su placa experimental de PCR en tiempo real.
3. Para el control negativo, agregue 8  $\mu\text{L}$  de NTC en lugar de la plantilla de ADN en el pocillo de control negativo. El volumen final debe ser de 20  $\mu\text{L}$ .
4. Para las muestras biológicas, agregue 8  $\mu\text{L}$  de cada muestra de ADN en los pocillos de muestra, de acuerdo con la configuración de su placa experimental. El volumen final en cada pocillo debe ser de 20  $\mu\text{L}$ .
5. Para el control positivo, agregue 8  $\mu\text{L}$  de *C. albicans* POS en lugar de la plantilla de ADN en los pocillos de control positivo. El volumen final debe ser de 20  $\mu\text{L}$ .
6. Cubra y selle la placa con una película o tapas adhesivas ópticas idóneas antes de continuar con los pasos de qPCR y detección.
7. Coloque la placa de reacción en el instrumento de PCR en tiempo real y ejecute el protocolo qPCR de acuerdo con la sección a continuación.

### 9.2. Programación del instrumento de PCR en tiempo real

La siguiente tabla muestra un protocolo estándar optimizado en algunas plataformas. Sin embargo, estas condiciones pueden adaptarse y validarse para ajustarse a diferentes protocolos específicos de la máquina.

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO	PASO
1	95 °C	3 min	Activación de la polimerasa
40	95 °C	5 s	Desnaturalización
	60 °C	30 s	Recocido/Extensión*

\* En función del instrumento de qPCR, seleccione los canales de detección adecuados. Los datos fluorogénicos deben recopilarse durante este paso a través de los canales FAM y HEX/JOE/VIC.

Los colorantes fluorescentes y los canales de detección utilizados para este kit son:

## Colorantes fluorescentes y canales de detección

DIANAS	COLORANTE FLUORESCENTE	CANALES DE DETECCIÓN
Gen específico de <i>C. albicans</i> (RPR1)	FAM™	FAM
Gen de la $\beta$ -actina humana (ACTB)	HEX™	HEX/JOE/VIC
<i>C. albicans</i> POS	FAM™ y HEX™	FAM y HEX/JOE/VIC

El Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, fue validado para los siguientes sistemas de PCR en tiempo real: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche Life Science LightCycler® 480 II y Bio-Rad® CFX96. Si se utiliza otro equipo, el kit debe ser validado por el usuario utilizando muestras previamente caracterizadas (tanto positivas como negativas).

## 10. Análisis de los datos

### 10.1. Ejecutar criterios de validación

Antes de analizar los resultados de las muestras, recomendamos verificar si la prueba de PCR en tiempo real es válida. Por lo tanto, para cada placa, confirme si los resultados de los controles Positivo y Negativo se realizaron como se esperaba, de acuerdo con los siguientes criterios:

**Control positivo:** la amplificación de FAM (*C. albicans*) y las curvas HEX (ACTB) son positivas. Se espera que el control positivo amplifique a  $20 < Ct < 25$ , en ambos canales FAM y HEX. El incumplimiento de este criterio de control de calidad es una fuerte indicación de que el experimento se ha visto comprometido.

**Control negativo (sin reacción de plantilla):** no se detecta amplificación. Si el control negativo tiene curvas de amplificación (FAM y HEX) con una forma sigmoideal, puede haber ocurrido contaminación de la muestra. Repita la prueba siguiendo buenas prácticas de qPCR.

Si los controles están de acuerdo con lo esperado, la prueba es **válida**. Continúe con la interpretación de los resultados de las muestras analizadas.

Si alguno de los controles no muestra el rendimiento esperado, la prueba se vio comprometida o se ejecutó incorrectamente y debe considerarse **inválida**.

**Por favor, repita la prueba.** Si el problema persiste, póngase en contacto con el fabricante.

### 10.2. Interpretación de los resultados de la prueba

***C. albicans* se detecta** si la curva de amplificación de FAM muestra una forma sigmoideal con un  $Ct \leq 36$ , independientemente del resultado que se obtenga para la prueba ACTB (HEX).

***C. albicans* no se detecta** si la curva FAM no se amplifica ( $Ct > 36$ ), mientras que la prueba ACTB (HEX) muestra una curva sigmoidea positiva con  $Ct \leq 40$ .

La **prueba no es válida** si las pruebas *C. albicans* y ACTB son negativos. La prueba debe repetirse con ácido nucleico repurificado de la muestra.

La siguiente tabla resume la interpretación de los principales resultados (evaluar la forma general de las curvas de amplificación; **solo las curvas de amplificación sigmoideales son indicativas de una amplificación real**).

<i>C. ALBICANS</i> (FAM)	ACTB (HEX)	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS
+ ( $Ct \leq 36$ )	+ ( $Ct \leq 40$ )	<i>C. albicans</i> → <b>POSITIVO</b>
+ ( $Ct \leq 36$ )	- ( $Ct > 40$ )*	<i>C. albicans</i> → <b>POSITIVO</b>
- ( $Ct > 36$ )	+ ( $Ct \leq 40$ )	<i>C. albicans</i> no detectado → <b>NEGATIVO</b>
- ( $Ct > 36$ )	- ( $Ct > 40$ )	Prueba no válida, repetir la extracción y ejecución de qPCR

\* No se requiere la detección del control interno en el canal de detección HEX para obtener resultados positivos en el canal de detección FAM. Una gran cantidad de ADN diana en la muestra puede hacer que la señal del control interno se reduzca considerablemente o esté ausente.

**Nota:** La interpretación de los resultados debe tener en cuenta la posibilidad de resultados falsos negativos y falsos positivos.

- Los resultados falsos negativos pueden deberse a:
  - Recolección, manipulación y/o almacenamiento inadecuado de las muestras.
  - Degradación de la muestra.
  - Presencia de inhibidores de qPCR.
  - Mutaciones en el genoma del organismo patógeno.
  - Incumplimiento de los procedimientos de este manual.
  - Uso de kit de extracción o plataforma de PCR en tiempo real no autorizados.
- Los resultados falsos positivos pueden deberse a:
  - Manipulación inadecuada de muestras que contienen alta concentración de ADN de *C. albicans*.
  - Manipulación inadecuada del control positivo *C. albicans* POS.
  - Manipulación inadecuada del producto amplificado (placa de postamplificación).

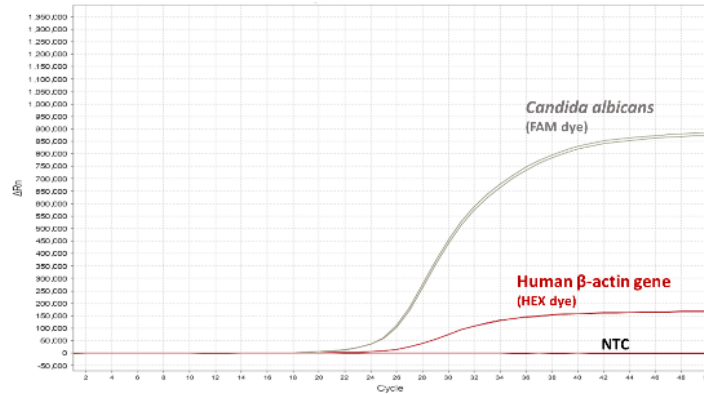
Los resultados negativos no excluyen la infección y el resultado de la prueba no debe utilizarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. Además, esta prueba no puede descartar enfermedades causadas por otros patógenos bacterianos o virales.

## 11. Evaluación del desempeño

El desempeño del Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, fue validado para los instrumentos: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5 y Bio-Rad® CFX96™. Si se utiliza otro equipo, el kit debe ser validado por el usuario utilizando muestras previamente caracterizadas (tanto positivas como negativas).

### 11.1. Resultados previstos

Un gráfico de amplificación típico observado para una muestra clínica positiva de *C. albicans* está presente en la Figura 1. En situaciones donde la muestra contiene altas cantidades de ADN de *C. albicans*, la curva del canal HEX, correspondiente al gen de la  $\beta$ -actina humana, puede estar ausente o exhibir una forma atípica.



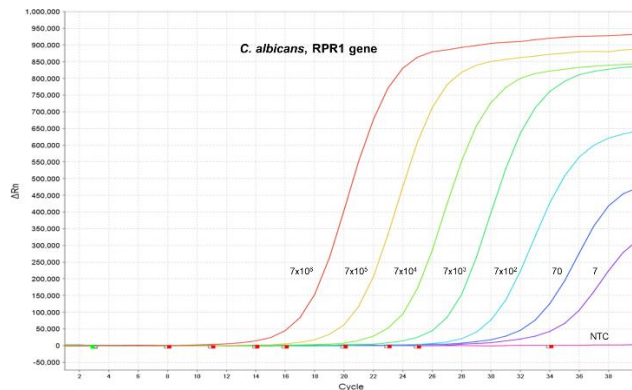
**Figura 1.** Detección de *C. albicans* y de genes de  $\beta$ -actina (ACTB) humana en una muestra clínica positiva de *C. albicans*. Curva gris: detección de la secuencia diana de *C. albicans* (gen RPR1) a través del canal FAM. Curva roja: detección de la secuencia de  $\beta$ -actina humana (ACTB) a través del canal HEX. Control negativo NTC.

### 11.2. Límite de detección (LoD) - Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se definió como la concentración más baja del analito que podía detectarse de forma fiable con un 95% de confianza. Esto se evaluó mediante pruebas de ácidos nucleicos de *C. albicans* en diferentes números de copias, agregados al ADN extraído de muestras vaginales negativas, utilizando 3 lotes de kits diferentes siguiendo las condiciones de reacción de prueba típicas. Las pruebas se repitieron durante 4 días, produciendo 48 repeticiones para cada concentración probada. Juntos, los datos revelaron que el Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, detecta 5 copias/reacción o 0,250 copias/ $\mu$ L de ADN de *C. albicans* con una confianza  $\geq 95\%$ . Por lo tanto, se determinó que el Límite de Detección (LoD) tentativo es de 250 copias/mL para *C. albicans*.

Los diferentes LoD fueron confirmados por dos operadores diferentes utilizando tres lotes de kits en un experimento con un total de 96 réplicas, lo que garantiza que la sensibilidad analítica se mantenga en diferentes condiciones de prueba. El estudio de LoD estableció las concentraciones más bajas de *C. albicans* (número de copias/mL) que el Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, puede detectar en al menos el 96% de los casos. Todas las pruebas se realizaron con el instrumento de PCR en tiempo real QuantStudio™ 5 de Applied Biosystems® y el análisis se realizó con el software del instrumento.

Por último, la capacidad del Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, para detectar el patógeno en diferentes rangos de carga se determinó analizando diferentes cargas de ácido nucleico en condiciones de prueba estándar. La Figura 2 muestra las curvas de amplificación para las diferentes cantidades de ácido nucleico.



**Figura 2.** Sensibilidad del Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech. Gráfica de amplificación (número de ciclos frente a fluorescencia -  $\Delta Rn$ ) de diluciones en serie 1:10 del ADN de *C. albicans*, de  $7 \times 10^6$  copias a 7 copias por reacción a través del canal FAM. NTC, Control Sin Plantilla (control negativo).

### 11.3. Reactividad analítica (inclusividad) y especificidad analítica

La inclusividad y la reactividad cruzada fueron evaluadas por análisis *in silico* de sondas y cebadores de oligonucleótidos contra patógenos relacionados con *C. albicans* y patógenos normales que causan infección con síntomas similares, respectivamente. Mediante los análisis *in silico*, se encontró que el diseño de la prueba detectaba *C. albicans* y no mostró reactividad con especies no relacionadas.



Se realizaron pruebas de reactividad cruzada (exclusividad) *in vitro* para confirmar que el Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, no reacciona con otros microorganismos colonizadores y patógenos que se encuentran comúnmente en muestras clínicas humanas del tracto vaginal. Este estudio se realizó utilizando un panel comercial de patógenos vaginales comercializado por ZeptoMetrix®, a saber, NATtrol™ Vaginal Panel® (#NATVP-BD). Este panel incluye muestras representativas de especímenes clínicos verdaderos de origen bacteriano y fúngico, incluidos *Atopobium vaginae* Z242, *Candida albicans* Z006, *Gardnerella vaginalis* Z247, *Lactobacillus crispatus* Z246, *Trichomonas vaginalis* Z070 y BVAB2 Recombinante. Los datos obtenidos usando tres lotes diferentes del kit confirmaron que, a excepción de *C. albicans* que como era de esperar fue identificado por el kit, ninguno de los microorganismos probados interfirió con el rendimiento del kit o generó una señal de amplificación detectable.

Además, el kit fue probado en la amplificación de ácidos nucleicos de microbios del tracto vaginal comunes, incluyendo *Actinomyces naeslundii*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Mesomycolasma lagogenitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus sp.* y *Veillonella parvula* (Leibniz-Institute DSMZ). Los datos obtenidos utilizando tres lotes de kits diferentes confirmaron que ninguno de los microorganismos probados interfirió con el rendimiento del kit o generó una señal de amplificación detectable. Así, considerando los organismos probados el kit tiene una especificidad analítica del 100%.

La interferencia de sustancias supuestamente encontradas en muestras vaginales sobre la sensibilidad de detección del Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, se evaluó en un ensayo con 33 posibles sustancias interferentes (consulte la tabla a continuación). En este estudio, las muestras artificiales se mezclaron con muestras vaginales preparadas con DNA de *C. albicans*. Se prepararon muestras artificiales añadiendo ADN de *C. albicans* a una concentración de 3x LoD a una matriz clínica negativa. También se han preparado muestras de control sin ADN de *C. albicans*. Las sustancias potencialmente interferentes se probaron en concentraciones que representan los niveles más altos esperados en muestras vaginales según una revisión de la literatura. También se incluyó un control negativo utilizando agua como sustancia añadida. Los datos revelaron que ninguna de las sustancias probadas interfiere con la sensibilidad de detección de *C. albicans* por el Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD. Todos los experimentos se realizaron en el instrumento de PCR en tiempo real QuantStudio™ 5 de Applied Biosystems®.

POTENCIAL INTERFERENTE	NOMBRE DE LA INTERFERENCIA	INGREDIENTE ACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL EN LA MUESTRA	INTERFERENCIA SÍ (S) O NO (N)
Antifúngico	Anidulafungina	Anidulafungina	5 mg/mL	N
Antifúngico	Flucitosina	Flucitosina	5 mg/mL	N
Antifúngico	Voriconazol	Voriconazol	5 mg/mL	N
Antifúngico	Anfotericina B	Anfotericina B (20 µg/mL)	10% v/v	N
Antimicrobianos	Gino-Canestén	Clotrimazol (10 mg/g)	10% w/v	N
Antimicrobianos	Lomexina	Nitrato de feticonazol	10% w/v	N
Medicina	Progeffik	Progesterona	5 mg/mL	N
Lavado	Betadine 100 mg/mL	Povidona yodada (100 mg/mL)	10% v/v	N
Lavado	Cien Gel Para Higiene Íntima	-	10% v/v	N
Lavado	Saugella Homme	Ácido láctico	10% v/v	N
Lavado	Jabón azul y blanco	-	10 mg/mL	N
Lavado	D'aveia Ginecológico	-	10% w/v	N
Lavado	Palmolive Glicerina Natural	Palmato de sodio y oleato de sodio	10 mg/mL	N
Lavado	Palmolive Indulging Delight	-	10 mg/mL	N
Lavado	Continente Gel Íntimo	-	10% v/v	N
Lubricante	Warm Up Cherry	-	10% v/v	N
Lubricante	Control - Thai Passion	-	10% v/v	N
Productos Tópicos	Lauroderme	Óxido de zinc (23 mg/g) + Ácido salicílico (2 mg/g)	10 mg/mL	N
Productos Tópicos	Crema Bepanthen	Dexpantenol (50 mg/g)	10% w/v	N
Productos Tópicos	Halibut	Óxido de zinc (150 mg/g)	10% w/v	N
Productos Tópicos	L-Mesitran Soft	40% miel de grado médico	10% w/v	N
Productos Tópicos	Climacare - Gel Vaginal	Ácido hialurónico y ácido láctico	10% v/v	N
Productos Tópicos	Elixir de Argán Oil & Go	Parafina líquida	10% v/v	N
Productos Tópicos	Hidratante Vaginal WOMAN ISDIN	Glicerina (11%)	10% v/v	N
Inhibidores naturales	Fluidos sexuales	-	Raspado en medio de transporte	N
Inhibidores naturales	Fluido seminal	-	5% v/v	N
Inhibidores naturales	Saliva	-	10% v/v	N
Inhibidores naturales	Orina	-	10% v/v	N



<b>Inhibidores naturales</b>	Sangre pura	Glucosa, Hormonas, Enzimas, Iones, Hierro etc.	10% v/v	N
<b>Inhibidores naturales</b>	Moco	Inmunoglobulina, Lizozima, Polímeros	Raspado en medio de transporte	N
<b>Inhibidores naturales</b>	Menstruación	-	Raspado en medio de transporte	N
<b>Inhibidores naturales</b>	Plasma	-	10% v/v	N
<b>Etanol absoluto</b>	Etanol	Alcohol	5% v/v	N

#### 11.4. Precisión

La precisión de la prueba para el *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, fue determinada por la prueba repetida de muestras positivas que representan dos niveles de carga de patógenos, 3x LoD y 30x LoD copias por reacción, añadidas al ADN extraído de muestras vaginales negativas, usando 3 lotes de kits diferentes y siguiendo las condiciones típicas de reacción de prueba. La precisión se evaluó midiendo el promedio de Cq, el coeficiente de variación de Cq y el % de detección de réplicas, como se describe a continuación para cada caso. Los datos se resumen en la tabla que se muestra a continuación.

##### 11.4.1. Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada por un operador mediante el análisis de 12 réplicas de cada muestra (3x LoD y 30x LoD copias por reacción), lo que representa un número final de 24 pruebas realizadas por diana.

##### 11.4.2. Reproducibilidad diaria

Un operador evaluó la reproducibilidad diaria analizando 48 réplicas de cada muestra (3x LoD y 30x LoD copias por reacción), durante 4 días, con 12 réplicas de cada concentración por día (se realizó un total de 96 ensayos por diana).

##### 11.4.3. Reproducibilidad lote a lote

Un operador evaluó la reproducibilidad entre lotes mediante el análisis de 72 réplicas de cada muestra (3x LoD y 30x LoD copias por reacción) utilizando 3 lotes de kits diferentes con 24 réplicas por lote.

##### 11.4.4. Reproducibilidad entre operadores

La reproducibilidad entre operadores se evaluó mediante la prueba de 36 réplicas de cada muestra (3x LoD y 30x LoD copias por reacción), por tres operadores diferentes con 12 repeticiones por operador.

##### 11.4.5. Reproducibilidad entre instrumentos

Un operador midió la reproducibilidad entre instrumentos mediante la prueba de 24 réplicas de cada muestra (3x LoD y 30x LoD copias por reacción), en cinco instrumentos de qPCR diferentes: Applied Biosystems® QuantStudio™ 5, Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® StepOnePlus, Roche® LightCycler 96™ y Bio-Rad® CFX96™, en un total de 60 pruebas por muestra.

#### Precisión del *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech.

VARIABLE		<i>C. albicans</i> (COPIAS/REACCIÓN)	
		3x LoD	30x LoD
<b>REPETIBILIDAD</b>	n	12	12
	Promedio de Cq	32,90	29,65
	Coeficiente de variación (%)	1,18	0,48
	% de detección de réplicas	100	100
<b>REPRODUCIBILIDAD DIARIA</b>	n	48	48
	Promedio de Cq	32,85	29,65
	Coeficiente de variación (%)	1,41	0,56
	% de detección de réplicas	100	100
<b>REPRODUCIBILIDAD LOTE A LOTE</b>	n	72	72
	Promedio de Cq	32,91	29,66
	Coeficiente de variación (%)	1,45	0,56
	% de detección de réplicas	100	100
<b>REPRODUCIBILIDAD ENTRE OPERADORES</b>	n	36	36
	Promedio de Cq	33,00	29,66
	Coeficiente de variación (%)	1,4	0,53
	% de detección de réplicas	100	100
<b>REPRODUCIBILIDAD ENTRE INSTRUMENTOS</b>	n	60	60
	Promedio de Cq	32,47	29,04
	Coeficiente de variación (%)	2,06	1,23
	% de detección de réplicas	100	100

### 11.5. Evaluación clínica

El desempeño clínico del Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, se evaluó utilizando muestras vaginales en un laboratorio de diagnóstico molecular independiente. El comparador fue un método de cultivo microbiológico de rutina. En total, se analizaron 20 muestras clínicas, a saber, 10 muestras negativas y 10 muestras clínicas positivas para *Candida albicans*. Los datos revelaron una concordancia del 100% para todas las muestras positivas y negativas analizadas.

### 12. Control de calidad

Todos los componentes del Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, se prueban siguiendo los protocolos descritos anteriormente. El sistema de qPCR dúplex permite la detección de dianas descritas para la identificación de ADN de *C. albicans*, así como el ADN humano (gen de la  $\beta$ -actina, ACTB). Se observan amplificaciones positivas para los genes diana, el control positivo y los controles internos a través de los canales FAM y HEX/JOE/VIC, según los colorantes marcadores del conjunto de cebadores/sonda respectivos.












### 13. Apoyo técnico

Para soporte técnico, comuníquese con nuestro equipo de soporte técnico dedicado por teléfono: +351 (0) 21 364 35 14 o correo electrónico: info@nzytech.com.

### 14. Marcas registradas y descargos de responsabilidad

Todas las marcas registradas que aparecen en este manual son propiedad de sus respectivos dueños.

### 15. Explicación de los símbolos

	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>		Consultar instrucciones de uso
	Número de catálogo		Fabricante
	Código de lote		Usar por
	Limitación de temperatura		Suficiente para
	Control positivo		Mantener alejado de la luz solar (mezcla de cebador/sonda)
	Control negativo		

## 16. Declaración de conformidad

**Nombre del producto:** Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD

**Número de catálogo:** MD04891

**Uso previsto:** Detección cualitativa de *Candida albicans*

**Clasificación:** Otros (no incluidos en el anexo II o no destinado a autodiagnóstico) según la Directiva 98/79/CE

**Fabricante:** NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Nosotros, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, declaramos por la presente que este producto, al que hace referencia esta declaración de conformidad, cumple con los siguientes estándares y demás documentos normativos ISO 9001:2015 e ISO 13485:2016, de acuerdo con las disposiciones de la Directiva 98/79/CE y Regulación (EU) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*, incorporada a la legislación nacional de los Estados Miembros de la Unión Europea.

El archivo técnico del producto se conserva en NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.



Dra. Joana Brás  
Directora técnica

## 17. Referencias

- Silva Dantas, A., Lee, K. K., Raziunaite, I., Schaefer, K., Wagener, J., Yadav, B., & Gow, N. A. (2016). Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. *Current opinion in microbiology*, 34, 111-118.
- Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). *Candida albicans*-Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control–An update. *Microbial pathogenesis*, 117, 128-138.
- Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 9(7), 327-335.
- <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/>. Fecha de acceso: 13/01/2022.
- Kozel, T. R., & Wickes, B. (2014). Fungal diagnostics. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(4), a019299.

