

Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD

Kit de PCR en temps réel Candida albicans, IVD

REF MD04891, 96 réactions

Réservé au diagnostic in vitro par des professionnels



FR

Mode d'emploi

MD0489_IM_fr

VERSION 2401, janvier 2024



Sommaire

1. Introduction	3
2. Utilisation prévue.....	3
3. Principes du test.....	3
4. Composition du kit.....	3
5. Conditions de stockage, de stabilité et de manipulation.....	4
6. Matériel et instrumentation requis mais non fournis	4
7. Prélèvement et préparation des échantillons	4
8. Précautions et avertissements.....	4
8.1. Information de sécurité	4
8.2. Exigences de manipulation et de procédure	4
9. Procédure de test.....	5
9.1. Configuration de la réaction	5
9.2. Programmation de l'instrument de PCR en temps réel.....	5
10. L'analyse des données	6
10.1. Critères de validation du test.....	6
10.2. Interprétation des résultats des tests.....	6
11. Évaluation des performances	7
11.1. Résultats attendus	7
11.2. Limite de détection (LoD) - Sensibilité analytique	7
11.3. Réactivité analytique (inclusivité) et spécificité analytique.....	7
11.4. Précision.....	9
11.4.1. Répétabilité.....	9
11.4.2. Reproductibilité quotidienne	9
11.4.3. Reproductibilité lot à lot	9
11.4.4. Reproductibilité de l'opérateur.....	9
11.4.5. Reproductibilité inter-instruments	9
11.5. Évaluation clinique.....	9
12. Contrôle de qualité	9
13. Assistance technique.....	10
14. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité	10
15. Explication des symboles	10
16. Déclaration de conformité.....	11
17. Les références	12

1. Introduction

Candida albicans est un champignon unicellulaire diploïde qui colonise naturellement le tractus intestinal humain de \pm 80% de la population. *C. albicans* est cependant une levure opportuniste qui peut provoquer des infections buccales et génitales. L'infection s'accompagne d'un changement morphologique d'un organisme unicellulaire à une forme filamenteuse multicellulaire pathogène. Dans la forme commensale, le champignon vit dans le tractus gastro-intestinal et sa croissance est régulée par d'autres micro-organismes ainsi que par le système immunitaire de l'hôte. Le basculement entre les formes commensales et pathogènes, connu sous le nom de basculement phénotypique, peut être régulé par une expression génique différentielle coordonnée par plusieurs facteurs de transcription. En fin de compte, le changement phénotypique vers la forme multicellulaire permet la pénétration de la membrane muqueuse à partir de laquelle l'infection est initiée. L'infection à *C. albicans* provoque une candidose, qui peut être superficielle ou systémique lorsqu'elle devient une maladie potentiellement mortelle. Les infections superficielles provoquent des symptômes tels que des démangeaisons et des irritations, qui peuvent généralement être éliminés avec des médicaments antifongiques. Néanmoins, les personnes dont le système immunitaire est affaibli ou qui sont atteintes de diabète ont un risque accru de développer une infection. Lorsque la prolifération se produit, elle peut entraîner des infections des voies urinaires, des infections génitales à levures, du muguet buccal et du muguet cutanéomuqueux. Dans les cas les plus graves, lorsque *C. albicans* pénètre dans la circulation sanguine ou les organes, il peut entraîner une perte de vision, des infections du sang et des os, une endocardite, une méningite ou une inflammation de la muqueuse intra-abdominale. La PCR en temps réel est la méthode la plus rapide et la plus fiable pour effectuer un diagnostic précis de l'infection à *C. albicans*.

2. Utilisation prévue

Le *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, est un test moléculaire basé sur la technologie PCR en temps réel, destiné à la détection rapide et au diagnostic qualitatif d'acides nucléiques pathogènes définis dans des échantillons biologiques humains. L'utilisation du kit est indiquée chez les patientes présentant des symptômes inflammatoires du tractus vaginal, pour le diagnostic et le contrôle de l'infection causée par *C. albicans*. L'application du kit ne dépend pas de la population et des aspects démographiques. Il n'y a pas de contre-indications à l'utilisation du *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD. Cependant, ce test sert de complément au diagnostic et son résultat doit être associé aux signes et symptômes cliniques d'une infection fongique. Ainsi, un résultat positif indique la présence d'ADN de *C. albicans*, mais une corrélation clinique à partir de l'historique et d'autres informations de diagnostic est nécessaire pour déterminer le statut infectieux du patient. Un résultat négatif n'exclut pas l'existence de *C. albicans* et ne doit pas être utilisé comme seul instrument pour la décision de traitement du patient. Les tests doivent être effectués par des techniciens de laboratoire spécialisés et qualifiés, notamment en technique de PCR en temps réel et en diagnostic moléculaire *in vitro*. Des échantillons cliniques appropriés comprennent des écouvillons vaginaux de cellules épithéliales. Le kit doit être utilisé uniquement comme indiqué dans ce manuel d'utilisation.

3. Principes du test

Le *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, fournit l'ensemble de réactifs, d'enzymes et d'oligonucléotides (amorces et sondes) pour la détection qualitative du génome de *C. albicans*, en utilisant la technique de PCR en temps réel (voir les exigences de spécification de l'équipement dans article 6). Le kit détecte le gène RPR1 qui a été précédemment identifié comme un bon marqueur génétique pour *C. albicans*. Le *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, a été conçu pour avoir un large profil de détection, tout en restant spécifique au génome de *C. albicans*. Les amorces et sondes du kit ont 100% d'homologie avec 100% des séquences de *C. albicans* disponibles dans la base de données GenBank (novembre 2022). De plus, l'ensemble d'oligonucléotides a été spécifiquement conçu pour la détection de cet organisme et ne présente pas d'homologie significative avec d'autres génomes, ce qui reflète la haute spécificité et la sensibilité de détection du test. En tant que tel, le kit a été conçu pour être spécifique au génome de *C. albicans* et pour éviter la détection d'autres organismes causant des infections vaginales. Le contrôle interne, inclus dans le kit, valide l'efficacité du procédé d'extraction ainsi que l'absence d'inhibiteurs de PCR potentiellement présents dans les échantillons biologiques humains. Périodiquement, NZYtech revisite la séquence du gène cible de *C. albicans* et, si nécessaire, publiera une nouvelle version de ce kit. De plus, le kit comprend deux contrôles externes (un contrôle positif et un contrôle négatif) comme décrit ci-dessous. Le contrôle positif est constitué de fragments d'acide nucléique contenant les deux séquences cibles détectées par le kit (gène fongique RPR1 et gène de la β -actine humaine).

Dans ce kit, la détection qualitative de l'ADN est basée sur la technologie PCR en temps réel, qui est une méthodologie de référence dans le diagnostic de laboratoire. Il s'agit d'une méthodologie de haute sensibilité et spécificité pour détecter avec précision la présence de cet organisme. Le *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, est basé sur le principe de la recherche de la présence d'ADN de champignon *Candida*, isolé et purifié avec un système d'extraction. L'ADN extrait est soumis à une amplification PCR, en une seule réaction, à l'aide de deux jeux d'amorces/sondes hautement spécifiques exploitant le principe TaqMan®. En présence d'ADN de *C. albicans*, la sonde TaqMan® se lie spécifiquement aux régions conservées du gène RPR1 flanquées de deux paires d'amorces spécifiques. Un deuxième jeu d'amorces/sonde sert de contrôle interne, détectant le gène de la β -actine humaine (ACTB), ce qui permet de confirmer l'efficacité du processus de capture du matériel biologique prélevé chez le patient. De plus, ce contrôle interne démontre qu'aucune inhibition de réaction ne s'est produite par les inhibiteurs de PCR potentiellement présents dans les échantillons cliniques/environnementaux. Pour permettre l'identification de l'amplification des deux cibles spécifiques en une seule réaction, des sondes spécifiques de *C. albicans* et de la β -actine humaine sont marquées avec des colorants rapporteurs FAM™ et HEX™, respectivement. Ainsi, ce kit consiste en un test duplex où la cible spécifique de *C. albicans* est détectée dans le canal optique FAM et le gène cible humain est détecté dans le canal optique HEX. Ces ensembles d'oligonucléotides/sondes sont fournis à des concentrations optimisées pour garantir que l'ADN humain, même lorsqu'il est présent à des concentrations extrêmement élevées, ne limite pas l'efficacité des ensembles d'amorces/sondes de *C. albicans*.

4. Composition du kit

Le *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, fournit un ensemble complet de réactifs suffisants pour effectuer 96 réactions qPCR en une seule étape.

COMPOSANT DU KIT		VOLUME (PAR FLACON)	NOMBRE DE TUBES
<i>C. albicans</i> MMix	NZYSupreme qPCR Probe Master Mix (2x)	1050 µL	1
<i>C. albicans</i> PPMix	<i>C. albicans</i> /amorces ACTB/sonde Mix	205 µL	1
<i>C. albicans</i> POS	<i>C. albicans</i> /contrôle positif ACTB	105 µL	1
NTC	Contrôle sans modèle	105 µL	1

5. Conditions de stockage, de stabilité et de manipulation

Le *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, est expédié réfrigéré. Dès réception du kit, tous les composants doivent être immédiatement stockés entre -85 °C et -15 °C. Lors de l'utilisation, les composants du kit doivent être rapidement placés dans le congélateur après utilisation afin de minimiser le temps d'exposition à la température ambiante. En outre:

- Minimisez le nombre de cycles de congélation-décongélation en stockant des aliquotes de travail. Le cas échéant, les composants du kit peuvent être aliquotés en plus petits volumes après décongélation.
- Le composant *C. albicans* PPMix doit être conservé à l'abri de la lumière. En particulier, ne pas exposer le NZYSupreme qPCR Probe Master Mix (2x) à la lumière directe du soleil après l'avoir combiné avec les amorces/le mélange de sondes.
- Si l'emballage qui protège le kit est arrivé endommagé, veuillez contacter NZYtech.
- Attention à la date de péremption indiquée sur l'emballage. NZYtech ne recommande pas d'utiliser le kit après la date de péremption. À cette date, le kit doit être jeté conformément aux instructions d'élimination de la **section 8.2**.

6. Matériel et instrumentation requis mais non fournis

- Instrument de PCR en temps réel qui détecte FAM™ et HEX™/JOE™/VIC™ (à des longueurs d'onde d'émission de 520 et 556 nm, respectivement). Voir au **section 11** les modèles d'instruments pour lesquels le kit a été validé.
- Équipement et consommables pour isoler l'ADN d'échantillons biologiques/cliniques.
- Matériel en plastique pour qPCR sans RNase/DNase : Tubes PCR de 1,5 ou 2 mL, barrettes, bouchons, plaques 96 puits, films adhésifs.
- Pipettes et pointes à filtre (sans RNase/DNase).
- Gants jetables.
- Vortex et centrifugeuse.

7. Prélèvement et préparation des échantillons

Le kit est conçu pour détecter l'ADN extrait de prélèvements vaginaux. Différents facteurs, tels que la procédure de collecte des échantillons biologiques, le transport, le stockage et le temps de traitement des échantillons, sont essentiels pour garantir l'intégrité des échantillons et obtenir des résultats optimaux. Les échantillons collectés doivent être testés dès que possible. Le prélèvement, la manipulation et/ou le transport inappropriés des échantillons peuvent entraîner un résultat erroné. Les acides nucléiques extraits constituent le matériel de départ pour le test avec le *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech. NZYtech recommande the use of NZY Plant/Fungi gDNA Isolation kit (MB177, NZYtech) for nucleic acids extraction, as this kit has been validated for the extraction of *C. albicans* samples. Veuillez vous assurer que les échantillons d'ADN sont appropriés en termes de pureté, de concentration et d'intégrité des acides nucléiques. L'éthanol étant un puissant inhibiteur de la PCR en temps réel, il est nécessaire d'éliminer ce composant avant l'élution des acides nucléiques lors du processus d'extraction. Le kit de NZYtech contient un contrôle interne qui cible l'ADN humain co-purifié avec l'ADN de *C. albicans*. L'ADN humain est amplifié avec l'ensemble d'oligonucléotides (amorces et sonde) du gène de la β -actine humaine. L'introduction du contrôle interne est utile pour évaluer l'efficacité de l'extraction et de l'isolement de l'ADN et/ou pour détecter la présence d'inhibiteurs potentiels pendant le traitement de l'échantillon.

8. Précautions et avertissements

Comme dans toute procédure de test analytique, de bonnes pratiques de laboratoire sont essentielles. Suivez attentivement les procédures et les directives fournies dans ce manuel pour vous assurer que le test est effectué correctement. Tout écart par rapport à ceux-ci peut entraîner un échec du test ou entraîner des résultats erronés. En raison de la sensibilité élevée du kit, des précautions particulières doivent être prises pour maintenir les réactifs et les mélanges d'amplification PCR exempts de contamination.

8.1. Information de sécurité

Avant d'utiliser le kit, veuillez consulter la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur le site Web de NZYtech (www.nzytech.com). Cette détection du kit doit être effectuée uniquement par du personnel formé aux procédures techniques et de sécurité pertinentes dans des laboratoires équipés de manière appropriée. Les directives internationales et nationales sur la sécurité biologique en laboratoire doivent être suivies en toutes circonstances.

8.2. Exigences de manipulation et de procédure

- Uniquement pour un usage professionnel de diagnostic *in vitro*.
- Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption.
- Ne pas utiliser les composants de test si le joint du kit est endommagé.
- Ne pas intervertir les réactifs de différents lots de production.
- Aucun réactif d'autres fabricants ne doit être utilisé avec les réactifs de ce kit de test.
- Des ustensiles en plastique jetables et des pipettes sans DNase/RNase doivent être utilisés dans toutes les procédures.

- La préparation des échantillons, la mise en place de la réaction et l'amplification doivent être effectuées dans différentes zones de travail. L'ordre des tâches dans le laboratoire doit être unidirectionnel. Portez toujours des gants jetables dans chaque zone et changez-les avant d'entrer dans une zone différente. Si possible, changez de manteau.
- Sélectionnez des matériaux et des équipements spécifiques pour chaque zone de travail individuelle et ne les transférez pas d'une zone à une autre.
- Les échantillons biologiques doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux en suivant les précautions de biosécurité appropriées.
- Le contrôle positif contient des modèles à nombre de copies élevé ; il doit être ouvert et traité à l'écart des échantillons de test et des composants du kit pour éviter toute contamination croisée.
- Utilisez toujours le NTC fourni dans le kit.
- Manipulez les plaques post-amplification avec soin et jetez-les immédiatement après la fin du test ; les plaques doivent toujours être jetées dans un récipient approprié pour les risques biologiques après utilisation.
- A la fin de chaque test, nettoyez/désinfectez les surfaces des aires de travail et des équipements avec une solution désinfectante appropriée pour éliminer toute trace d'acides nucléiques.
- Les résidus de produits chimiques et de préparations sont généralement considérés comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales.
- Tous les résultats doivent être interprétés par un professionnel de la santé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes cliniques du patient.
- Ce test ne peut pas exclure les maladies causées par d'autres agents pathogènes.
- Un résultat négatif pour tout test PCR n'exclut pas de manière concluante la possibilité d'une infection.
- Suivre les bonnes pratiques de laboratoire, porter des vêtements de protection, porter en permanence des gants jetables non poudrés, utiliser des lunettes et un masque. Ne pas manger, boire ou fumer dans la zone de travail.

9. Procédure de test

Veillez lire attentivement les instructions d'utilisation avant d'effectuer le test. Méfiez-vous que les étapes de pipetage et la configuration de la plaque doivent être effectuées sur des refroidisseurs de paillasse ou de la glace. Une fois la plaque coulée, démarrez immédiatement le protocole PCR en temps réel. Une incubation prolongée des mélanges réactionnels à température ambiante peut entraîner des artefacts de PCR qui réduisent la sensibilité de détection. Avant l'expérience, mélanger doucement les tubes de réaction fournis, centrifuger pendant 5 secondes pour recueillir le contenu au fond du tube et placer les tubes sur de la glace. **Nous recommandons fortement de pipeter C. albicans POS, le kit Positive Control, en dernier pour éviter les contaminations croisées.**

9.1. Configuration de la réaction

1. Préparer un mélange qPCR suffisant pour le nombre de tests à effectuer avec un volume supplémentaire de 5% pour les pertes de pipetage. Procéder selon le tableau ci-dessous qui précise les volumes pour 1 et n essais (où n correspond au nombre total de réactions) :

COMPOSANT	1 TEST VOLUME (µL)	n TESTS (*) VOLUME + 5% (µL)
C. albicans MMix	10	n x 10,5
C. albicans PPMix	2	n x 2,1
VOLUME FINAL	12	n x 12,6

(*) Pour calculer le nombre total de réactions nécessaires pour chaque test, comptez le nombre d'échantillons et ajoutez-en deux de plus pour le contrôle négatif et le contrôle positif, respectivement.

2. Pipetez 12 µL du mélange qPCR dans des puits individuels en fonction de la configuration de votre plaque expérimentale PCR en temps réel.
3. Pour le contrôle négatif, ajouter 8 µL de NTC au lieu de ma trice d'ADN dans le puits de contrôle négatif. Le volume final doit être de 20 µL.
4. Pour les échantillons biologiques, ajoutez 8 µL de chaque échantillon d'ADN dans les puits d'échantillon, selon la configuration de votre plaque expérimentale. Le volume final dans chaque puits doit être de 20 µL.
5. Pour le contrôle positif, ajouter 8 µL de C. albicans POS au lieu de matrice d'ADN dans les puits de contrôle positif. Le volume final doit être de 20 µL.
6. Couvrir et sceller la plaque avec un film ou des capuchons adhésifs optiques appropriés avant de procéder aux étapes de qPCR et de détection.
7. Placez la plaque de réaction dans l'instrument de PCR en temps réel et exécutez le protocole qPCR conformément à la section ci-dessous.

9.2. Programmation de l'instrument de PCR en temps réel

Le tableau ci-dessous affiche un protocole standard optimisé sur quelques plates-formes. Cependant, ces conditions peuvent être adaptées et validées pour s'adapter à différents protocoles spécifiques à la machine.

CYCLES	TEMPERATURE	TEMPS	PAS
1	95 °C	3 min	Activation de la polymérase
40	95 °C	5 s	Dénaturation
	60 °C	30 s	Hybridation/Extension*

* En fonction de l'instrument qPCR, sélectionnez les canaux de détection appropriés. Les données fluorogènes doivent être collectées au cours de cette étape via les canaux FAM et HEX/JOE/VIC.

Les colorants fluorescents et les canaux de détection utilisés pour ce kit sont :

Colorants fluorescents et canaux de détection

CIBLES	UN COLORANT FLUORESCENT	CANAUX DE DETECTION
Gène spécifique de <i>C. albicans</i> (RPR1)	FAM™	FAM
Gène de la β -actine humaine (ACTB)	HEX™	HEX/JOE/VIC
<i>C. albicans</i> POS	FAM™ & HEX™	FAM & HEX/JOE/VIC

Le Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, a été validé pour les systèmes de PCR en temps réel suivants : Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche Life Science LightCycler® 480 II et Bio-Rad® CFX96. Si d'autres équipements sont utilisés, le kit doit être validé par l'utilisateur en utilisant des échantillons préalablement caractérisés (positifs et négatifs).

10. L'analyse des données

10.1. Critères de validation du test

Avant d'analyser les résultats des échantillons, nous vous recommandons de vérifier si le test PCR en temps réel est valide. Ainsi, pour chaque plaque, veuillez confirmer si les résultats des contrôles positifs et négatifs se sont déroulés comme prévu, selon les critères suivants :

Contrôle positif : les amplifications des courbes FAM (*C. albicans*) et HEX (ACTB) sont positives. Le contrôle positif devrait s'amplifier à $20 < Ct < 25$, dans les deux canaux FAM et HEX. Le non-respect de ce critère de contrôle de la qualité est une forte indication que l'expérience a été compromise.

Contrôle négatif (pas de réaction matrice) : aucune amplification n'est détectée. Si le contrôle négatif a des courbes d'amplification (FAM et HEX) avec une forme sigmoïdale, une contamination de l'échantillon peut s'être produite. Répétez le test en suivant les bonnes pratiques de qPCR.

Si les contrôles sont conformes aux attentes, le test est valide. Veuillez procéder à l'interprétation des résultats pour les échantillons testés.

Si l'un des contrôles ne présente pas les performances attendues, le test a été compromis ou exécuté de manière incorrecte et doit être considéré comme non valide. **Veuillez répéter le test.** Si le problème persiste, contactez le fabricant

10.2. Interprétation des résultats des tests

***C. albicans* est détecté** si la courbe d'amplification FAM affiche une forme sigmoïdale avec un $Ct \leq 36$, quel que soit le résultat obtenu pour le test ACTB (HEX).

***C. albicans* n'est pas détecté** si la courbe FAM ne s'amplifie pas ($Ct > 36$), tandis que le test ACTB (HEX) affiche une courbe sigmoïdale positive avec $Ct \leq 40$.

Le **test est invalide** si les tests *C. albicans* e ACTB sont négatifs. Le test doit être répété avec l'acide nucléique repurifié à partir de l'échantillon.

Le tableau suivant résume l'interprétation des principaux résultats (évaluer la forme globale des courbes d'amplification ; seules les courbes d'amplification sigmoïdales sont indicatives d'une véritable amplification).

<i>C. ALBICANS</i> (FAM)	ACTB (HEX)	INTERPRETATION DES RESULTATS
+ ($Ct \leq 36$)	+ ($Ct \leq 40$)	<i>C. albicans</i> → POSITIF
+ ($Ct \leq 36$)	- ($Ct > 40$)*	<i>C. albicans</i> → POSITIF
- ($Ct > 36$)	+ ($Ct \leq 40$)	<i>C. albicans</i> non détecté → NÉGATIF
- ($Ct > 36$)	- ($Ct > 40$)	Test invalide, répétez l'extraction et l'analyse qPCR

*La détection du contrôle interne sur le canal de détection HEX n'est pas nécessaire pour des résultats positifs sur le canal de détection FAM. De grandes quantités d'ADN cible dans l'échantillon peuvent entraîner une forte réduction ou une absence du signal du contrôle interne.

Note: L'interprétation des résultats doit tenir compte de la possibilité de résultats faux négatifs et faux positifs.

- Des résultats faussement négatifs peuvent être causés par :
 - Collecte, manipulation et/ou stockage inappropriés des échantillons.
 - Dégradation de l'échantillon.
 - Présence d'inhibiteurs de qPCR.
 - Mutations dans le génome de l'organisme pathogène.
 - Non-respect des procédures de ce manuel.
 - Utilisation d'un kit d'extraction non autorisé ou d'une plateforme de PCR en temps réel.
- Des résultats faussement positifs peuvent être causés par :
 - Manipulation inappropriée d'échantillons contenant une forte concentration d'ADN de *C. albicans*.
 - Manipulation inadaptée du contrôle positif *C. albicans* POS.
 - Manipulation inadaptée du produit amplifié (plaque post-amplification).

Les résultats négatifs n'excluent pas l'infection et le résultat du test ne doit pas être utilisé comme seule base pour le traitement ou d'autres décisions de gestion du patient. De plus, ce test ne peut pas exclure les maladies causées par d'autres agents pathogènes bactériens ou viraux.

11. Évaluation des performances

Les performances du Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, ont été validées pour les instruments : Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5 et Bio-Rad® CFX96™. Si d'autres équipements sont utilisés, le kit doit être validé par l'utilisateur à l'aide d'échantillons préalablement caractérisés (positifs et négatifs).

11.1. Résultats attendus

Un tracé d'amplification typique observé pour un échantillon clinique positif de *C. albicans* est présent à la figure 1. Dans les situations où l'échantillon contient de grandes quantités d'ADN de *C. albicans*, la courbe du canal HEX, correspondant au gène de la β -actine humaine, peut être absente ou présenter une forme atypique.

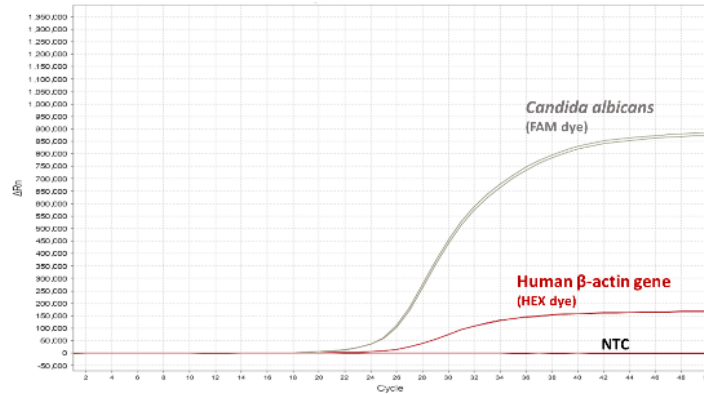


Figure 1. Détection des gènes de *C. albicans* et de la β -actine humaine (ACTB) dans un échantillon clinique positif de *C. albicans*. Courbe grise : détection de la séquence cible de *C. albicans* (gène RPR1) par le canal FAM. Courbe rouge : détection de la séquence β -actine humaine (ACTB) par le canal HEX. Contrôle négatif NTC.

11.2. Limite de détection (LoD) - Sensibilité analytique

La sensibilité analytique a été définie comme la plus faible concentration d'analyte pouvant être détectée de manière fiable avec une confiance de 95%. Cela a été évalué en testant les acides nucléiques de *C. albicans* à différents nombres de copies, enrichis en ADN extrait d'échantillons vaginaux négatifs, en utilisant 3 lots de kits différents suivant des conditions de réaction de test typiques. Les tests ont été répétés sur 4 jours, produisant 48 répétitions pour chaque concentration testée. Ensemble, les données ont révélé que le Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, détecte 5 copies/réaction ou 0,250 copies/ μ L d'ADN de *C. albicans* avec une confiance $\geq 95\%$. Ainsi, la limite de détection provisoire (LoD) a été déterminée à 250 copies/mL pour *C. albicans*.

Les différentes LoD ont été confirmées par deux opérateurs différents à l'aide de trois lots de kits dans une expérience avec un total de 96 répétitions, garantissant ainsi que la sensibilité analytique est maintenue dans différentes conditions de test. L'étude LoD a établi les plus faibles concentrations de *C. albicans* (nombre de copies/mL) pouvant être détectées par le Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD dans au moins 96% des cas. Tous les tests ont été effectués à l'aide de l'instrument de PCR en temps réel Applied Biosystems® QuantStudio™ 5 et l'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel de l'instrument.

Enfin, la capacité du Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, à détecter l'agent pathogène à différentes plages de charge a été déterminée en testant différentes charges d'acide nucléique dans des conditions de test standard. La figure 2 affiche les courbes d'amplification pour les différentes quantités d'acide nucléique.

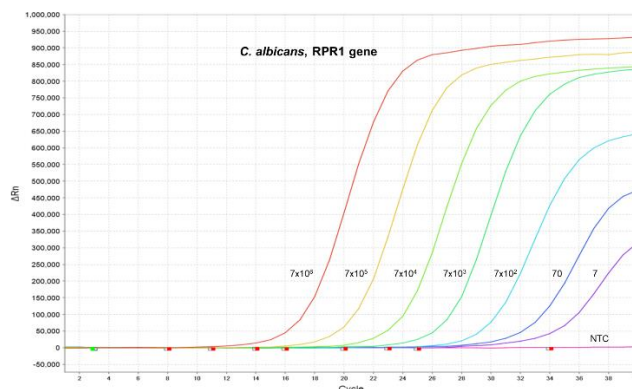


Figure 2. Sensibilité du Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech. Parcelle d'amplification (nombre de cycles par rapport à la fluorescence - Δ Rn) de dilutions en série 1:10 de l'ADN de *C. albicans*, de 7×10^6 copies à 7 copies par réaction via le canal FAM. NTC, No Template Control (contrôle négatif).

11.3. Réactivité analytique (inclusivité) et spécificité analytique

L'inclusivité et la réactivité croisée ont été évaluées par analyse *in silico* de sondes oligonucléotidiques et d'amorces contre des agents pathogènes liés à *C. albicans* et des agents pathogènes normaux qui provoquent une infection avec des symptômes similaires, respectivement. Lors d'une analyse *in silico*, la conception du test s'est avérée détecter *C. albicans* et n'a montré aucune réactivité avec des espèces non apparentées.

Des tests de réactivité croisée *in vitro* (exclusivité) ont été effectués pour confirmer que le Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD ne réagit pas avec d'autres micro-organismes colonisateurs et pathogènes couramment trouvés dans les échantillons cliniques humains du tractus vaginal. Cette étude a été réalisée à l'aide d'un panel commercial de pathogènes vaginaux commercialisé par ZeptoMetrix®, à savoir le NATrol™ Vaginal Panel® (#NATVP-BD). Ce panel comprend des échantillons représentatifs de véritables spécimens cliniques d'origine bactérienne et fongique, y compris *Atopobium vaginae* Z242, *Candida albicans* Z006, *Gardnerella vaginalis* Z247, *Lactobacillus crispatus* Z246, *Trichomonas vaginalis* Z070 et BVAB2 Recombinant. Les données obtenues à l'aide de trois lots différents du kit ont confirmé que, à l'exception de *C. albicans* qui, comme prévu, a été identifié par le kit, aucun des micro-organismes testés n'a interféré avec les performances du kit ou généré un signal d'amplification détectable.

En outre, le kit a été testé dans l'amplification des acides nucléiques de microbes courants du tractus vaginal, notamment *Actinomyces naeslundii*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Mesomycolasma lagogenitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus sp.* et *Veillonella parvula* (Leibniz-Institut DSMZ). Les données obtenues à l'aide de trois lots de kits différents ont confirmé qu'aucun des micro-organismes testés n'a interféré avec les performances du kit ou généré un signal d'amplification détectable. Ainsi, compte tenu des organismes testés, le kit a une spécificité analytique de 100%.

L'interférence par des substances potentiellement trouvées dans des échantillons vaginaux sur la sensibilité de détection par le Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, a été évaluée dans un test utilisant 33 substances potentiellement interférentes (voir tableau ci-dessous). Dans cette étude, des échantillons artificiels ont été mélangés avec des échantillons vaginaux fabriqués avec de l'ADN de *C. albicans*. Des échantillons artificiels ont été préparés en ajoutant de l'ADN de *C. albicans* à une concentration de 3x LoD à une matrice clinique négative. Des échantillons de contrôle sans ADN de *C. albicans* ont également été préparés. Les substances potentiellement interférentes ont été testées à des concentrations qui représentent les niveaux les plus élevés attendus dans les échantillons vaginaux sur la base d'une revue de la littérature. Un témoin négatif utilisant de l'eau comme substance ajoutée a également été inclus. Les données ont révélé qu'aucune des substances testées n'interfère avec la sensibilité de détection de *C. albicans* par le Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD. Toutes les expériences ont été réalisées sur l'instrument de PCR en temps réel Applied Biosystems® QuantStudio™ 5.

INTERFERENCE POTENTIELLE	NOM INTERFERENT	INGREDIENT ACTIF	CONCENTRATION FINALE DANS L'ECHANTILLON	INTERFERENCE OUI (O) OU NON (N)
Antifongique	Anidulafungine	Anidulafungine	5 mg/mL	N
Antifongique	Flucytosine	Flucytosine	5 mg/mL	N
Antifongique	Voriconazole	Voriconazole	5 mg/mL	N
Antifongique	Amphotéricine B	Amphotéricine B (20 µg/mL)	10% v/v	N
Antimicrobiens	Gino-Canesten	Clotrimazole (10 mg/g)	10% w/v	N
Antimicrobiens	Lomexine	Nitrate de fenticonazole	10% w/v	N
Médecine	Progeffik	Progestérone	5 mg/mL	N
Lavage	Bétadine 100 mg/mL	Povidone iodée (100 mg/ml)	10% v/v	N
Lavage	Cien Gel Para Higiene Íntima	-	10% v/v	N
Lavage	Saugella Homme	Acide lactique	10% v/v	N
Lavage	Sabão azul e branco	-	10 mg/mL	N
Lavage	D'aveia Ginecológico	-	10% w/v	N
Lavage	Palmolive Glicerina Natural	Palmate de sodium et oléate de sodium	10 mg/mL	N
Lavage	Palmolive Indulging Delight	-	10 mg/mL	N
Lavage	Continente Gel Íntimo	-	10% v/v	N
Lubrifiant	Warm Up Cherry	-	10% v/v	N
Lubrifiant	Control - Thai Passion	-	10% v/v	N
Produits topiques	Lauroderme	Oxyde de zinc (23mg/g) + Acide salicylique (2mg/g)	10 mg/mL	N
Produits topiques	Bepanthen Pomada	Dexpanténol (50 mg/g)	10% w/v	N
Produits topiques	Halibut	Oxyde de zinc (150mg/g)	10% w/v	N
Produits topiques	L-Mesitran Soft	40% de miel de qualité médicale	10% w/v	N
Produits topiques	Climacare - Gel Vaginal	Acide hyaluronique & Acide lactique	10% v/v	N
Produits topiques	Elixir de Argan Oil & Go	Liquide de paraffine	10% v/v	N
Produits topiques	WOMAN ISDIN Hydratant Vaginal	Glycérine (11%)	10% v/v	N
Inhibiteurs naturels	Fluides sexuels	-	Grattage dans le milieu de transport	N
Inhibiteurs naturels	Liquide séminal	-	5% v/v	N
Inhibiteurs naturels	Salive	-	10% v/v	N
Inhibiteurs naturels	Urine	-	10% v/v	N
Inhibiteurs naturels	Sang	Glucose, Hormones, Enzymes, Ions, Fer, etc.	10% v/v	N
Inhibiteurs naturels	Mucus	Immunoglobuline, Lysozyme, Polymères	Grattage dans le milieu de transport	N
Inhibiteurs naturels	Menstruation	-	Grattage dans le milieu de transport	N
Inhibiteurs naturels	Plasma	-	10% v/v	N
Éthanol absolu	Éthanol	Alcool	5% v/v	N

11.4. Précision

La précision du test pour le *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech a été déterminée par le test répété d'échantillons positifs représentant deux niveaux de charge pathogène, 3x LoD et 30x copies LoD par réaction, enrichis en ADN extrait d'échantillons vaginaux négatifs, en utilisant 3 différents lots de kits et en suivant les conditions de réaction de test typiques. La précision a été évaluée en mesurant la moyenne Cq, le coefficient de variation Cq et le % de détection répétée, comme décrit ci-dessous pour chaque cas. Les données sont reprises dans le tableau affiché ci-dessous.

11.4.1. Répétabilité

La répétabilité a été évaluée par un opérateur en analysant 12 répétitions de chaque échantillon (copies 3x LoD et 30x LoD par réaction), représentant un nombre final de 24 tests effectués par cible.

11.4.2. Reproductibilité quotidienne

La reproductibilité quotidienne a été évaluée par un opérateur en analysant 48 répliques de chaque échantillon (copies 3x LoD et 30x LoD par réaction), pendant 4 jours, avec 12 répliques de chaque concentration par jour (un total de 96 tests par cible ont été effectués).

11.4.3. Reproductibilité lot à lot

La reproductibilité entre les lots a été évaluée par un opérateur grâce à l'analyse de 72 répliques de chaque échantillon (copies 3x LoD et 30x LoD par réaction) en utilisant 3 lots de kits différents avec 24 répliques par lot.

11.4.4. Reproductibilité de l'opérateur

La reproductibilité de l'opérateur a été évaluée en testant 36 répliques de chaque échantillon (copies 3x LoD et 30x LoD par réaction), par trois opérateurs différents avec 12 répliques par opérateur.

11.4.5. Reproductibilité inter-instruments

La reproductibilité inter-instruments a été mesurée par un opérateur en testant 24 répliques de chaque échantillon (copies 3x LoD et 30x LoD par réaction), dans cinq instruments qPCR différents : Applied Biosystems® QuantStudio™ 5, Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® StepOnePlus, Roche® LightCycler 96™ et Bio-Rad® CFX96™, pour un total de 60 tests par échantillon.

Précision du *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech.

VARIABLE		<i>C. albicans</i> (COPIES/REACTION)	
		3x LoD	30x LoD
REPETABILITE	n	12	12
	Cq moyen	32,90	29,65
	Coefficient de variation (%)	1,18	0,48
	% de détection de réplication	100	100
REPRODUCTIBILITE QUOTIDIENNE	n	48	48
	Cq moyen	32,85	29,65
	Coefficient de variation (%)	1,41	0,56
	% de détection de réplication	100	100
REPRODUCTIBILITE LOT A LOT	n	72	72
	Cq moyen	32,91	29,66
	Coefficient de variation (%)	1,45	0,56
	% de détection de réplication	100	100
REPRODUCTIBILITE DE L'OPERATEUR	n	36	36
	Cq moyen	33,00	29,66
	Coefficient de variation (%)	1,4	0,53
	% de détection de réplication	100	100
INTER-INSTRUMENT REPRODUCTIBILITE	n	60	60
	Cq moyen	32,47	29,04
	Coefficient de variation (%)	2,06	1,23
	% de détection de réplication	100	100

11.5. Évaluation clinique

Les performances cliniques du *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, ont été évaluées à l'aide d'échantillons vaginaux, dans un laboratoire de diagnostic moléculaire indépendant. Le comparateur était une méthode de culture microbiologique de routine. Au total, 20 échantillons cliniques ont été testés, à savoir 10 échantillons négatifs et 10 échantillons cliniques positifs pour *Candida albicans*. Les données ont révélé une concordance de 100% pour tous les échantillons positifs et négatifs testés.

12. Contrôle de qualité

Tous les composants du *Candida albicans* Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, sont testés selon les protocoles décrits ci-dessus. Le système qPCR duplex permet la détection des cibles décrites pour l'identification de l'ADN de *C. albicans* ainsi que de l'ADN humain (gène de la β -actine, ACTB). Des amplifications positives sont observées pour les gènes cibles, le contrôle positif et les contrôles internes via les canaux FAM et HEX/JOE/VIC, selon les colorants rapporteurs respectifs des amorces/sondes.












13. Assistance technique

Pour le support technique, veuillez contacter notre équipe de support technique dédiée par téléphone : +351 (0) 21 364 35 14 ou Courriel : info@nzytech.com.

14. Marques de commerce et clauses de non-responsabilité

Toutes les marques déposées qui apparaissent dans ce manuel sont la propriété de leurs propriétaires respectifs.

15. Explication des symboles

	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>		Consulter les instructions d'utilisation
	Numéro de catalogue		Fabricant
	Code du lot		Utiliser par
	Limitation de température		Suffisant pour
	Contrôle positif		Tenir à l'écart de la lumière du soleil (mélange amorce/sonde)
	Contrôle négatif		

16. Déclaration de conformité

Nom du produit : Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD

Numéro de catalogue: MD04891

Utilisation prévue Détection qualitative de *Candida albicans*

Classification : Autre (qui ne sont pas couverts par l'annexe II ou non destiné à autodiagnostic) selon la Directive 98/79/CE

Fabricant: NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Nous, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, déclarons que ce produit, auquel se réfère cette déclaration de conformité, est conforme aux normes standard ISO 9001:2015 et ISO 13485:2016, conformément aux dispositions de la directive 98/79/CE et le règlement (UE) 2017/746 appliqué aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*, transposé dans les législations nationales des États membres de l'Union européenne.

Le dossier technique du produit est conservé chez NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.



Joana Brás, PhD
Diretora Técnica

17. Les références

- 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/>. Date d'accès : 13/ 01/ 2022.
- Kozel, T. R., & Wickes, B. (2014). Fungal diagnostics. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(4), a019299.

