Candida albicans RT-PCR-Kit, IVD

REF MD04891, 96 Reaktionen

Nur für den professionellen Einsatz in der *In-vitro*-Diagnostik

CE IVD

DE

Gebrauchsanweisung (IFU)

IM-008de

VERSION 02/2022, Dezember 2022

NZYTech genes & enzymes
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lissabon, Portugal
Tel.:+351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com

Inhalt

1. Einleitung 3
2. Bestimmungsgemäße Verwendung 3
3. Prinzipien des Testverfahrens 5
4. Zusammensetzung des Kits 6
5. Lagerungs-, Stabilitäts- und Handhabungsbedingungen 6
6. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Instrumente 6
7. Probenentnahme und -vorbereitung 7
8. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise 7
8.1 Sicherheitshinweise 7
8.2 Handhabung und verfahrenstechnische Anforderungen 7
9. Prüfverfahren 8
9.1 Vorbereitung der Reaktion 9
9.2 Programmierung des RT-PCR-Geräts 9
10. Datenanalyse 10
10.1 Kriterien für die Laufvalidierung 10
10.2 Interpretation der Testergebnisse 11
11. Bewertung der Leistung 12
11.1 Erwartete Ergebnisse 12
11.2 Nachweisgrenze (LoD) - Analytische Sensitivität 13
11.3 Analytische Reaktivität (Inklusivität) und analytische Spezifität 13
11.4 Präzision 16
11.4.1. Wiederholbarkeit 16
11.4.2. Tägliche Reproduzierbarkeit 16
11.4.3. Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge 17
11.4.4. Operator-Reproduzierbarkeit 17
11.4.5. Reproduzierbarkeit zwischen den Instrumenten 17
11.5 Klinische Bewertung 18
12. Qualitätskontrolle 18

13. Technische Unterstützung 18
14. Warenzeichen und Haftungsausschlüsse 18
15. Erläuterung von Symbolen 19
16. Konformitätserklärung 20
17. Referenzen 21

1. Einleitung

Candida albicans ist ein diploider, einzelliger Pilz, der auf natürliche Weise den menschlichen Darmtrakt von ± 80 % der Bevölkerung besiedelt. *C. albicans* ist jedoch ein opportunistischer Hefepilz, der orale und genitale Infektionen verursachen kann. Die Infektion geht mit einer morphologischen Veränderung von einem einzelligen Organismus zu einer pathogenen multizellulären, fadenförmigen Form einher. In der kommensalen Form lebt der Pilz im Magen-Darm-Trakt und sein Wachstum wird durch andere Mikroorganismen sowie das Immunsystem des Wirts reguliert. Der Wechsel zwischen kommensaler und pathogener Form, der so genannte phänotypische Wechsel, kann durch eine unterschiedliche Genexpression reguliert werden, die von mehreren Transkriptionsfaktoren koordiniert wird. Letztlich ermöglicht die phänotypische Veränderung zur vielzelligen Form das Eindringen in die Schleimhaut, von der aus die Infektion initiiert wird. Eine Infektion mit *C. albicans* verursacht eine Candidose, die oberflächlich oder systemisch verlaufen kann, wenn sie zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung wird. Oberflächliche Infektionen verursachen Symptome wie Juckreiz und Reizungen, die in der Regel mit antimykotischen Medikamenten beseitigt werden können. Personen mit einem geschwächten Immunsystem oder mit Diabetes haben jedoch ein erhöhtes Risiko, an einer Infektion zu erkranken. Eine Überwucherung kann zu Harnwegsinfektionen, genitalen Hefeinfektionen, Mundsoor und Schleimhautsoor führen. In den schwersten Fällen, wenn *C. albicans* in den Blutkreislauf oder in Organe eindringt, kann es zu Sehstörungen, Blut- und Knocheninfektionen, Endokarditis, Meningitis oder Entzündungen der intraabdominellen Schleimhaut führen. Die Echtzeit-PCR ist die schnellste und zuverlässigste Methode, um eine genaue Diagnose einer *C. albicans*-Infektion zu stellen.

2. Bestimmungsgemäße Verwendung

Das Candida albicans RT-PCR-Kit, IVD, von NZYTech ist ein molekularer Test, der auf der Echtzeit-PCR-Technologie basiert und für den schnellen Nachweis und die qualitative Diagnose von definierten pathogenen Nukleinsäuren in menschlichen biologischen Proben bestimmt ist. Die Verwendung des Kits ist bei Patientinnen mit Entzündungssymptomen des Vaginaltrakts zur Diagnose und Kontrolle einer durch *C. albicans* verursachten Infektion angezeigt. Die Anwendung des Kits ist unabhängig von der Bevölkerung und demographischen Aspekten. Es gibt keine Kontraindikationen für die Verwendung des RT-PCR-Nachweiskits für *C. albicans.* Dieser Test dient jedoch als Hilfsmittel für die Diagnose und sein Ergebnis sollte mit den klinischen Anzeichen und Symptomen einer Pilzinfektion kombiniert werden. So weist ein positives Ergebnis auf das Vorhandensein von *C.-albicans*-DNA hin, doch ist eine klinische Korrelation anhand der Anamnese und anderer diagnostischer Informationen erforderlich, um

den Infektionsstatus des Patienten zu bestimmen. Ein negatives Ergebnis schließt das Vorhandensein von *C. albicans* nicht aus und sollte nicht als alleiniges Instrument für die Behandlungsentscheidung des Patienten verwendet werden. Die Tests müssen von spezialisierten und qualifizierten Labortechnikern durchgeführt werden, insbesondere in der RT-PCR-Technik und der molekularen *In-vitro*-Diagnostik. Zu den geeigneten klinischen Proben gehören vaginale Abstriche von Epithelzellen. Das Kit sollte nur wie in dieser Gebrauchsanweisung angegeben verwendet werden.

3. Prinzipien des Testverfahrens

Das Candida albicans RT-PCR-Kit, IVD, von NZYTech bietet einen Satz von Reagenzien, Enzymen und Oligonukleotiden (Primer und Sonden) für den qualitativen Nachweis des *C. albicans*-Genoms unter Verwendung der RT-PCR-Technik (siehe Gerätespezifikationsanforderungen in Abschnitt 6). Das Kit weist das *RPR1*-Gen nach, das zuvor als ein guter genetischer Marker für *C. albicans* identifiziert wurde. Das Candida albicans RT-PCR Kit, IVD, von NZYTech wurde so konzipiert, dass es ein breites Nachweisprofil aufweist, aber dennoch spezifisch für das *C. albicans*-Genom ist. Die Primer und Sonden des Kits weisen eine 100%ige Homologie zu 100% der in der GenBank-Datenbank (November 2022) verfügbaren *C. albicans*-Sequenzen auf. Darüber hinaus wurde der Oligonukleotidsatz speziell für den Nachweis dieses Organismus entwickelt und weist keine signifikante Homologie mit anderen Genomen auf, was die hohe Spezifität und Nachweisempfindlichkeit des Tests widerspiegeln. Der Test ist somit spezifisch für das Genom von *C. albicans* und verhindert den Nachweis anderer Organismen, die Vaginalinfektionen verursachen. Die im Kit enthaltene interne Kontrolle validiert die Wirksamkeit des Extraktionsverfahrens sowie die Abwesenheit von PCR-Inhibitoren, die möglicherweise in den biologischen Proben des Menschen vorhanden sind. In regelmäßigen Abständen überprüft NZYTech die *C. albicans*-Zielgensequenz und bringt bei Bedarf eine neue Version dieses Kits heraus. Zusätzlich enthält das Kit zwei externe Kontrollen (eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle), wie unten beschrieben. Die Positivkontrolle besteht aus Nukleinsäurefragmenten, die die beiden mit dem Kit nachgewiesenen Zielsequenzen (*RPR1*-Pilzgen und das humane *β-Aktin*-Gen) enthalten.

In diesem Kit basiert der qualitative Nachweis von DNA auf der RT-PCR-Technologie, die eine Referenzmethode in der Labordiagnostik ist. Es handelt sich um eine Methode mit hoher Sensitivität und Spezifität, um das Vorhandensein dieses Organismus genau nachzuweisen. Das NZYTech Candida albicans RT-PCR Kit, IVD, basiert auf dem Prinzip der Untersuchung des Vorhandenseins von Candida-Pilz-DNA, die mit einem Extraktionssystem isoliert und gereinigt wird. Die extrahierte DNA wird in einer einzigen Reaktion einer PCR-Amplifikation unter Verwendung von zwei hochspezifischen Primer/Sonden-Sets nach dem TaqMan®-Prinzip unterzogen. In Gegenwart von *C. albicans*-DNA bindet die TaqMan®-Sonde spezifisch an konservierte Regionen des *RPR1*-Gens, die von zwei spezifischen Primerpaaren flankiert werden. Ein zweites Primer-/Sondenpaar dient als interne Kontrolle zum Nachweis des humanen *β-Aktin*-Gens (*ACTB*), mit dem die Effizienz des Verfahrens zur Erfassung des vom Patienten entnommenen biologischen Materials bestätigt werden kann. Darüber hinaus zeigt diese interne Kontrolle, dass keine Reaktionshemmung durch PCR-Inhibitoren, die möglicherweise in den klinischen/umgebenden Proben vorhanden sind, stattgefunden hat. Um die Identifizierung der Amplifikation der zwei spezifischen Ziele in einer einzigen Reaktion zu ermöglichen, werden Sonden, die für *C. albicans* und für menschliches *β-Aktin* spezifisch sind, mit FAM™- bzw. HEX™-Reporterfarbstoffen markiert. Somit besteht dieses Kit aus einem Duplex-Assay, bei dem das für *C. albicans* spezifische Ziel im optischen FAM-Kanal und das menschliche Zielgen im optischen HEX-Kanal nachgewiesen wird. Diese Oligonukleotide/Sondensätze werden in optimierten Konzentrationen bereitgestellt, um sicherzustellen, dass die menschliche DNA, selbst wenn sie in extrem hohen Konzentrationen vorhanden ist, die Effizienz der *C. albicans*-Primer/Sondensätze nicht einschränkt.

4. Zusammensetzung des Kits

Das Candida albicans RT-PCR Kit, IVD, von NZYTech bietet einen umfassenden Satz von Reagenzien, die ausreichen, um 96 RT-PCR-Reaktionen in einem einzigen Schritt durchzuführen.

Bestandteile des Kits		**Volumen (pro Fläschchen)**	**Anzahl der Röhrchen**
C. albicans MMix	NZYSupreme qPCR Probe Master Mix (2x)	1050 µL	1
C. albicans PPMix	*C. albicans*/*ACTB* Primer/Sonden-Mix	205 µL	1
C. albicans POS	*C. albicans*/*ACTB*-Positivkontrolle	105 µL	1
NTC	No Template Control	105 µL	1

5. Lagerungs-, Stabilitäts- und Handhabungsbedingungen

Das Candida albicans RT-PCR Kit, IVD, von NZYTech wird gekühlt versandt. Alle Komponenten sollten sofort nach Ankunft bei -85°C bis -15°C gelagert werden. Bei Verwendung sollten die Kit-Komponenten sofort nach Gebrauch in den Gefrierschrank zurückgelegt werden, um die Zeit in Raumtemperatur-Umgebung zu minimieren. Außerdem:

- Minimieren Sie die Anzahl der Einfrier-Auftauzyklen durch Lagerung in Arbeitsaliquoten. Gegebenenfalls können die Kit-Komponenten nach dem Auftauen in kleineren Volumina aliquotiert werden.
- Die *C. albicans* PPMix-Komponente sollten vor Licht geschützt gelagert werden. Insbesondere sollte der NZYSupreme qPCR Probe Master Mix (2x) nach der Kombination mit dem Primer/Sonden-Mix nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt werden.
- Sollte die Verpackung, die das Kit schützt, beschädigt ankommen, kontaktieren Sie bitte NZYTech.
- Achten Sie auf das auf der Verpackung angegebene Verfallsdatum. NZYTech rät davon ab, das Kit nach Ablauf des Verfallsdatums zu verwenden. Nach Ablauf des Verfallsdatums muss das Kit gemäß den Entsorgungsanweisungen in **Abschnitt 8.2** entsorgt werden.

6. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Instrumente

- Echtzeit-PCR-Instrument zum Nachweis von FAM und HEX/JOE/VIC (bei Emissionswellenlängen von 520 bzw. 556 nm). Siehe in **Abschnitt 11** die Gerätemodelle, für die das Kit validiert wurde.
- Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Isolierung von DNA aus biologischen/klinischen Proben.
- RNase/DNase-freie qPCR-Plastikware: PCR-Röhrchen von 1,5 oder 2 mL, Streifen, Kappen, 96-Well-Platten, Klebefilme.
- Pipetten und Filterspitzen (RNase/DNase frei).
- Einweghandschuhe.
- Vortex und Zentrifuge.

7. Probenentnahme und -vorbereitung

Das Kit ist für den Nachweis von aus Vaginalabstrichen extrahierter DNA konzipiert. Verschiedene Faktoren wie das Verfahren der biologischen Probenentnahme, der Transport, die Lagerung und die Verarbeitungszeit der Proben sind entscheidend, um die Integrität der Proben zu gewährleisten und optimale Ergebnisse zu erzielen. Die entnommenen Proben sollten so schnell wie möglich getestet werden. Eine unsachgemäße Probenentnahme, Handhabung und/oder Transport der Proben kann zu einem falschen Ergebnis führen. Extrahierte Nukleinsäuren bilden das Ausgangsmaterial für den Test mit dem Candida albicans RT-PCR Kit, IVD von NZYTech. NZYTech empfiehlt die Verwendung des NZY Plant/Fungi gDNA Isolation Kits (MB177, NZYTech) zur Nukleinsäureextraktion, da dieses Kit für die Extraktion von *C. albicans*-Proben validiert wurde. Bitte stellen Sie sicher, dass die DNA-Proben hinsichtlich Reinheit, Konzentration und Nukleinsäureintegrität geeignet sind. Da Ethanol ein starker Inhibitor der RT-PCR ist, müssen diese Komponente vor der Elution der Nukleinsäuren während des Extraktionsprozesses eliminiert werden. Das Kit von NZYTech enthält eine interne Kontrolle, die auf menschliche DNA abzielt, die zusammen mit *C. albicans*-DNA gereinigt wurde. Die menschliche DNA wird mit dem Oligonukleotidsatz (Primer und Sonde) aus dem menschlichen *β-Aktin*-Gen amplifiziert. Die Einführung der internen Kontrolle ist nützlich, um die Effizienz der DNA-Extraktion und -Isolierung zu bewerten und/oder um das Vorhandensein potenzieller Inhibitoren während der Probenverarbeitung nachzuweisen.

8. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Wie bei jedem analytischen Testverfahren ist eine gute Laborpraxis unerlässlich. Befolgen Sie sorgfältig die in diesem Handbuch beschriebenen Verfahren und Richtlinien, um sicherzustellen, dass der Test korrekt durchgeführt wird. Jegliche Abweichung davon kann zum Versagen des Tests oder zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Kits muss besonders darauf geachtet werden, dass die Reagenzien und PCR-Amplifikationsmischungen frei von Verunreinigungen sind.

8.1 Sicherheitshinweise

Vor der Verwendung des Kits lesen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt (SDB), das auf der NZYTech-Website (www.nzytech.com) verfügbar ist. Der Nachweis mit diesem Kit sollte nur von Personal durchgeführt werden, das in den entsprechenden technischen und sicherheitstechnischen Verfahren in entsprechend ausgestatteten Labors geschult ist. Die internationalen und nationalen Richtlinien zur biologischen Sicherheit im Labor sollten unter allen Umständen befolgt werden.

8.2 Handhabung und verfahrenstechnische Anforderungen

- Nur für den professionellen Einsatz in der *In-vitro*-Diagnostik.
- Dieses Kit darf nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Verwenden Sie die Testkomponenten nicht, wenn die Versiegelung des Kits beschädigt ist.
- Reagenzien verschiedener Produktionschargen dürfen nicht ausgetauscht werden.
- Es dürfen keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit Reagenzien dieses Testkits verwendet werden.
- Bei allen Verfahren sollten DNase/RNase-freie Einweg-Plastikbehälter und Pipetten verwendet werden.

- Die Probenvorbereitung, der Reaktionsaufbau und die Amplifikation sollten in verschiedenen Arbeitsbereichen durchgeführt werden. Die Reihenfolge der Aufgaben im Labor sollte unidirektional sein. Tragen Sie in jedem Bereich Einweghandschuhe und wechseln Sie diese, bevor Sie einen anderen Bereich betreten. Wenn möglich, wechseln Sie Ihren Labormantel.
- Wählen Sie für jeden einzelnen Arbeitsbereich spezifische Materialien und Ausrüstungen aus und übertragen Sie diese nicht von einem Bereich in einen anderen.
- Biologische Proben müssen so behandelt werden, als ob sie infektiös wären, und zwar unter Beachtung der entsprechenden biologischen Sicherheitsvorkehrungen.
- Die Positivkontrolle enthält eine große Anzahl von Vorlagen. Sie sollte geöffnet und außerhalb der Testproben und Kit-Komponenten verarbeitet werden, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie stets das im Kit mitgelieferte NTC.
- Gehen Sie mit den Post-Amplifikationsplatten vorsichtig um und entsorgen Sie sie sofort nach Beendigung des Tests; die Platten sollten nach Gebrauch immer in einem geeigneten Behälter für biologische Gefahrenstoffe entsorgt werden.
- Nach jedem Test sind die Oberflächen der Arbeitsbereiche und Geräte mit einer geeigneten Desinfektionslösung zu reinigen/desinfizieren, um alle Spuren von Nukleinsäuren zu entfernen.
- Rückstände von Chemikalien und Präparaten gelten im Allgemeinen als gefährlicher Abfall. Die Entsorgung dieser Art von Abfall wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt.
- Alle Ergebnisse sollten von einer medizinischen Fachkraft im Zusammenhang mit der Krankengeschichte und den klinischen Symptomen des Patienten interpretiert werden.
- Dieser Test kann Krankheiten, die durch andere Krankheitserreger verursacht werden, nicht ausschließen.
- Ein negatives Ergebnis bei einem PCR-Test schließt die Möglichkeit einer Infektion nicht endgültig aus.
- Befolgen Sie gute Laborpraktiken, tragen Sie Schutzkleidung, tragen Sie ständig puderfreie Einweghandschuhe, verwenden Sie Schutzbrille und Mundschutz. Essen, trinken und rauchen Sie nicht im Arbeitsbereich.

9. Prüfverfahren

Bitte lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie den Test durchführen. Beachten Sie, dass die Pipettierschritte und das Aufstellen der Platte auf einem Tischkühler oder auf Eis durchgeführt werden sollten. Nach dem Ausgießen der Platte sofort mit dem RT-PCR-Protokoll beginnen. Eine längere Inkubation der Reaktionsgemischen bei Raumtemperatur kann zu PCR-Artefakten führen, die die Empfindlichkeit des Nachweises verringern. Vor dem Experiment die mitgelieferten Reaktionsgefäße vorsichtig mischen, 5 Sekunden lang zentrifugieren, um den Inhalt am Boden des Gefäßes zu sammeln, und stellen Sie dann die Gefäße auf Eis. **Wir empfehlen dringend, C. albicans POS, die Positivkontrolle des Kits, zuletzt zu pipettieren, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.**

9.1 Vorbereitung der Reaktion

1. Bereiten Sie eine qPCR-Mischung vor, die für die Anzahl der durchzuführenden Tests ausreicht, mit einem zusätzlichen Volumen von 5 % für Pipettierungsverluste. Gehen Sie gemäß der nachstehenden Tabelle vor, in der die Volumina für 1 und n Tests angegeben sind (wobei n der Gesamtzahl der Reaktionen entspricht):

Komponente	**1 Test Volumen (µL)**	***n* Tests (*) Volumen + 5% (µL)**
C. albicans MMix	10	*n* x 10.5
C. albicans PPMix	2	*n* x 2.1
Finales Volumen	**12**	***n* x 12.6**

(*) Um die Gesamtzahl der für jeden Test benötigten Reaktionen zu berechnen, zählen Sie die Anzahl der Proben und fügen Sie jeweils zwei weitere für die Negativ- und die Positivkontrolle hinzu.

2. Pipettieren Sie 12 µL der qPCR-Mischung in die einzelnen Vertiefungen entsprechend dem Aufbau Ihrer RT-PCR-Versuchsplatte.

3. Für die Negativkontrolle geben Sie 8 µL NTC anstelle des DNA-Templates in die Vertiefung für die Negativkontrolle. Das Endvolumen sollte 20 µL betragen.

4. Für die biologischen Proben fügen Sie 8 µL jeder DNA-Probe in die Probenvertiefungen hinzu, entsprechend dem Aufbau Ihrer Versuchsplatte. Das Endvolumen in jeder Vertiefung sollte 20 µL betragen.

5. Für die Positivkontrolle geben Sie 8 µL C. albicans POS anstelle der DNA-Vorlage in die Vertiefungen der Positivkontrolle. Das Endvolumen sollte 20 µL betragen.

6. Bedecken und versiegeln Sie die Platte mit einer geeigneten optischen Klebefilm oder Kappen, bevor Sie mit den qPCR- und Detektionsschritten fortfahren.

7. Legen Sie die Reaktionsplatte in das RT-PCR-Gerät und führen Sie das qPCR-Protokoll gemäß dem folgenden Abschnitt aus.

9.2 Programmierung des RT-PCR-Geräts

Die folgende Tabelle zeigt ein Standardprotokoll, das für einige Plattformen optimiert wurde. Diese Bedingungen können jedoch angepasst und validiert werden, um für verschiedene maschinenspezifische Protokolle geeignet zu sein.

Zyklen	Temperatur	Zeit	Schritt
1	95 °C	3 min	Polymerase-Aktivierung
40	95 °C	5 s	Denaturierung
	60 °C	30 s	Glühen/Erweiterung*

* Je nach RT-PCR-Gerät geeignete Detektionskanäle auswählen. *Fluorogene Daten sollten während dieses Schritts über die Kanäle FAM und HEX/JOE/VIC erfasst werden.*

Die für dieses Kit verwendeten Fluoreszierende Farbstoffe und Detektionskanäle sind:

Fluoreszierende Farbstoffe & Detektionskanäle

Ziele	Fluoreszierender Farbstoff	Detektionskanäle
C. albicans (RPR1) spezifisches Gen	FAM™	FAM
Menschliches β-Aktin (ACTB) Gen	HEX™	HEX/JOE/VIC
C. albicans POS	FAM™ & HEX™	FAM & HEX/JOE/VIC

Das Candida albicans Echtzeit PCR Kit, IVD, von NZYTech wurde für die folgenden RT-PCR-Systeme validiert: Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5, Roche Life Science LightCycler® 480 II und Bio-Rad® CFX96. Wenn andere Geräte verwendet werden, sollte das Kit vom Benutzer validiert werden, indem zuvor charakterisierte Proben (sowohl positive als auch negative) verwendet werden.

10. Datenanalyse

10.1 Kriterien für die Laufvalidierung

Vor der Analyse der Probenergebnisse empfehlen wir zu überprüfen, ob der RT-PCR-Test gültig ist. Prüfen Sie daher für jede Platte, ob die Ergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen gemäß den folgenden Kriterien wie erwartet ausfallen:

- **Positivkontrolle**: Die Amplifikation der FAM- (*C. albicans*) und HEX-Kurven (*ACTB*) ist positiv. Von der Positivkontrolle wird erwartet, dass sie bei 20<Ct<25 in beiden Kanälen FAM und HEX amplifiziert. Wird dieses Qualitätskontrollkriterium nicht erfüllt, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass das Experiment beeinträchtigt wurde.

- **Negativkontrolle (NTC)**: Es wird keine Amplifikation festgestellt. Wenn die Negativkontrolle Amplifikationskurven (FAM und HEX) mit einer sigmoidalen Form aufweist, kann eine Probenkontamination stattgefunden haben. Wiederholen Sie den Test nach guter qPCR-Praxis.

Wenn die Kontrollen mit den Erwartungen übereinstimmen, ist der Test **gültig**. Fahren Sie bitte mit der Auswertung der Ergebnisse für die getesteten Proben fort.
Wenn eine der Kontrollen nicht die erwartete Leistung zeigt, wurde der Test beeinträchtigt oder unsachgemäß durchgeführt und sollte als **ungültig** betrachtet werden. **Bitte wiederholen Sie den Test.** Wenn das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an den Hersteller.

10.2 Interpretation der Testergebnisse

***C. albicans* wird nachgewiesen**, wenn die FAM-Amplifikationskurve eine sigmoidale Form mit einem Ct≤36 aufweist, unabhängig davon, welches Ergebnis für den *ACTB* (HEX)-Test erzielt wird.

***C. albicans* wird nicht nachgewiesen**, wenn die FAM-Kurve nicht amplifiziert (Ct>36), während der *ACTB* (HEX)-Assay eine positive Sigmoidalkurve mit Ct≤40 anzeigt.

Der **Test ist ungültig**, wenn die Tests für *C. albicans* und *ACTB* negativ sind. Der Test sollte mit aus der Probe neu aufgereinigter Nukleinsäure wiederholt werden.

Die folgende Tabelle fasst die Interpretation der wichtigsten Ergebnisse zusammen (bewerten Sie die Gesamtform der Amplifikationskurven; **nur sigmoidale Amplifikationskurven sind ein Hinweis auf eine echte Amplifikation).**

C. albicans (FAM)	**ACTB** (HEX)	**Interpretation der Ergebnisse**
+ (Ct≤36)	+ (Ct≤40)	*C. albicans* → **POSITIV**
+ (Ct≤36)	- (Ct>40)*	*C. albicans* → **POSITIV**
- (Ct>36)	+ (Ct≤40)	*C. albicans* nicht nachgewiesen → **NEGATIV**
- (Ct>36)	- (Ct>40)	Ungültiger Test, Extraktion und qPCR-Lauf wiederholen

* *Der Nachweis der internen Kontrolle auf dem HEX-Detektionskanal ist für positive Ergebnisse auf dem FAM-Detektionskanal nicht erforderlich. Hohe Mengen an Ziel-DNA in der Probe können dazu führen, dass das Signal der Internen Kontrolle stark reduziert oder nicht vorhanden ist.*

Anmerkung: Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die Möglichkeit falsch negativer und falsch positiver Ergebnisse berücksichtigt werden.

• Falsch negative Ergebnisse können verursacht werden durch:

- Ungeeignete Entnahme, Handhabung und/oder Lagerung der Proben.
- Zersetzung der Probe.
- Vorhandensein von qPCR-Inhibitoren.
- Mutationen im Genom des pathogenen Organismus.
- Nichteinhaltung der in diesem Handbuch beschriebenen Verfahren.
- Verwendung eines nicht zugelassenen Extraktionskits oder einer nicht zugelassenen RT-PCR-Plattform.

• Falsch positive Ergebnisse können verursacht werden durch:

- Ungeeignete Handhabung von Proben, die eine hohe Konzentration an DNA von *C. albicans* enthalten.
- Ungeeignete Handhabung der Positivkontrolle C. albicans POS.
- Ungeeignete Handhabung des amplifizierten Produkts (Post-Amplifikationsplatte).

Negative Ergebnisse schließen eine Infektion nicht aus, und das Testergebnis sollte nicht als alleinige Grundlage für die Behandlung oder andere Entscheidungen zur Behandlung des Patienten verwendet werden. Darüber hinaus kann dieser Test Krankheiten, die durch andere bakterielle oder virale Krankheitserreger verursacht werden, nicht ausschließen.

11. Bewertung der Leistung

Die Leistung des Candida albicans RT-PCR Kits, IVD, von NZYTech wurde für die folgenden Geräte validiert: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5 und Bio-Rad® CFX96™. Wenn andere Geräte verwendet werden, sollte das Kit vom Benutzer anhand von zuvor charakterisierten Proben (sowohl positiv als auch negativ) validiert werden.

11.1 Erwartete Ergebnisse

Eine typische Amplifikationskurve für eine klinische *C. albicans*-positive Probe ist in Abbildung 1 dargestellt. In Situationen, in denen die Probe große Mengen an *C. albicans*-DNA enthält, kann die HEX/JOE/VIC-Kanalkurve, die dem menschlichen *β-Aktin*-Gen entspricht, fehlen oder eine atypische Form aufweisen.

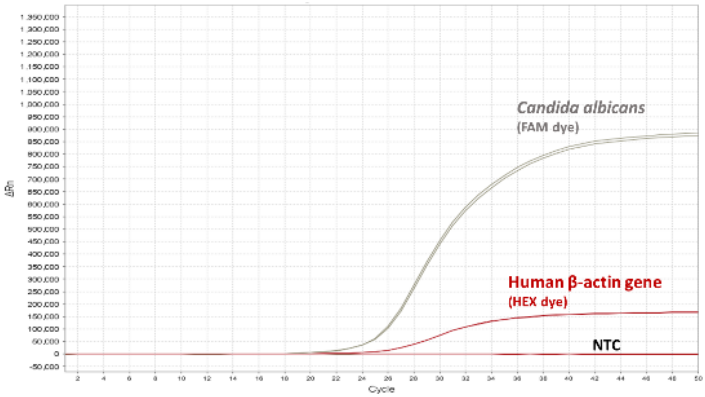

Abbildung 1. Nachweis von *C. albicans*- und humanen *β-Aktin* (*ACTB*)-Genen in einer klinischen *C. albicans*-positiven Probe. Graue Kurve: Nachweis der *C. albicans*-Zielsequenz (*RPR1*-Gen) über den FAM-Kanal. Rote Kurve: Nachweis der menschlichen *β-Aktin*-Sequenz (*ACTB*) über den HEX-Kanal. NTC-Negativkontrolle.

11.2 Nachweisgrenze (LoD) - Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität wurde als die niedrigste Konzentration des Analyten definiert, die mit 95%iger Sicherheit zuverlässig nachgewiesen werden konnte. Dies wurde durch das Testen von *C. albicans*-Nukleinsäuren mit unterschiedlichen Kopienzahlen, die mit DNA aus negativen Vaginalproben versetzt wurden, unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen und unter typischen Testreaktionsbedingungen bewertet. Die Tests wurden über 4 Tage hinweg wiederholt, wobei für jede getestete Konzentration 48 Wiederholungen erzielt wurden. Insgesamt ergaben die Daten, dass der Candida albicans RT-PCR Kit, IVD von NZYTech 5 Kopien/Reaktion oder 0.250 Kopien/µL *C. albicans* DNA mit einer Sicherheit ≥95% nachweist. Somit wurde die vorläufige Nachweisgrenze (LoD) für *C. albicans* auf 250 Kopien/mL festgelegt.

Die verschiedenen LoDs wurden von zwei verschiedenen Anwendern unter Verwendung von drei Kit-Chargen in einem Experiment mit insgesamt 96 Wiederholungen bestätigt, um sicherzustellen, dass die analytische Sensitivität unter verschiedenen Testbedingungen erhalten bleibt. In der LoD-Studie wurden die niedrigsten Konzentrationen von *C. albicans* (Kopienzahl/mL) ermittelt, die mit dem Candida albicans RT-PCR Kit, IVD, in mindestens 96 % der Fälle nachgewiesen werden können. Alle Tests wurden mit dem Applied Biosystem® QuantStudio™ 5 Echtzeit PCR-Gerät durchgeführt, und die Analyse erfolgte mit der Software des Geräts.

Schließlich wurde die Fähigkeit des Candida albicans RT-PCR-Kits, IVD, von NZYTech, den Erreger in verschiedenen Belastungsbereichen nachzuweisen, durch Testen verschiedener Nukleinsäurebelastungen unter Standardtestbedingungen bestimmt. Abbildung 2 zeigt die Amplifikationskurven für die verschiedenen Nukleinsäuremengen.

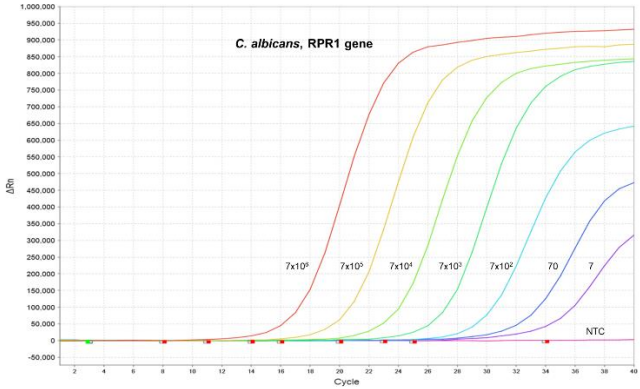

Abbildung 2. Empfindlichkeit des Candida albicans RT-PCR-Kits von NZYTech, IVD. Amplifikationsplot (Zykluszahl gegen Fluoreszenz - ΔRN) von 1:10 seriellen Verdünnungen der *C. albicans* DNA, von 7 x 10^6 Kopien bis 7 Kopien pro Reaktion durch den FAM-Kanal. NTC, keine Template-Kontrolle (Negativkontrolle).

11.3 Analytische Reaktivität (Inklusivität) und analytische Spezifität

Inklusivität und Kreuzreaktivität wurden durch *In-silico* Analyse von Oligonukleotidsonden und Primern gegen Pathogene, die mit *C. albicans* verwandt sind, bzw. gegen normale Pathogene,

die Infektionen mit ähnlichen Symptomen verursachen, bewertet. Die *In-silico* Analyse ergab, dass das Testdesign *C. albicans* nachweist und keine Reaktivität mit nicht verwandten Arten aufweist.

Es wurden *In-vitro*-Kreuzreaktivitätstests (Exklusivität) durchgeführt, um zu bestätigen, dass das Candida albicans RT-PCR Kit, IVD nicht mit anderen kolonisierenden und pathogenen Mikroorganismen reagiert, die üblicherweise in menschlichen klinischen Proben des Vaginaltrakts vorkommen. Diese Studie wurde mit einem kommerziellen Panel vaginaler Pathogene durchgeführt, das von ZeptoMetrix® vermarktet wird, nämlich dem NATtrol™ Vaginal Panel® (#NATVP-BD). Dieses Panel umfasst repräsentative Proben echter klinischer Proben bakteriellen und pilzlichen Ursprungs, darunter *Atopobium vaginae* Z242, *Candida albicans* Z006, *Gardnerella vaginalis* Z247, *Lactobacillus crispatus* Z246, *Trichomonas vaginalis* Z070 und BVAB2 Rekombinant. Die mit drei verschiedenen Chargen des Kits gewonnenen Daten bestätigten, dass mit Ausnahme von *C. albicans*, das erwartungsgemäß vom Kit identifiziert wurde, keiner der getesteten Mikroorganismen die Leistung des Kits beeinträchtigte oder ein nachweisbares Verstärkungssignal erzeugte.

Darüber hinaus wurde das Kit bei der Amplifikation von Nukleinsäuren gängiger Vaginaltrakt - Mikroben getestet, darunter *Actinomyces naeslundii, Candida glabrata, Candida tropicalis, Chlamydia trachomatis, Gardnerella vaginalis, Lactobacillus acidophilus, Mesomycoplasma lagogenitalium, Mycoplasma hominis, Neisseria gonorrhoeae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus sp.* und *Veillonella parvula* (Leibniz-Institut DSMZ). Die mit drei verschiedenen Kit-Chargen gewonnenen Daten bestätigten, dass keiner der getesteten Mikroorganismen die Leistung des Kits beeinträchtigt oder ein nachweisbares Amplifikationssignal erzeugt. Unter Berücksichtigung der getesteten Organismen hat das Kit somit eine analytische Spezifität von 100 %.

Die Beeinflussung der Nachweisempfindlichkeit des Candida albicans RT-PCR Kits, IVD durch Substanzen, die vermutlich in Vaginalproben vorkommen, wurde in einem Test mit 33 potenziellen Störsubstanzen (siehe Tabelle unten) bewertet. In dieser Studie wurden künstliche Proben mit Vaginalproben gemischt, die mit *C. albicans*-DNA hergestellt wurden. Die künstlichen Proben wurden durch Zugabe von *C. albicans*-DNA in dreifacher LoD-Konzentration zu einer negativen klinischen Matrix hergestellt. Es wurden auch Kontrollproben ohne *C. albicans*-DNA hergestellt. Potenziell störende Substanzen wurden in Konzentrationen getestet, die den höchsten in Vaginalproben zu erwartenden Konzentrationen auf der Grundlage einer Literaturübersicht entsprechen. Eine Negativkontrolle mit Wasser als zugesetzter Substanz wurde ebenfalls einbezogen. Die Daten zeigten, dass keine der getesteten Substanzen die Empfindlichkeit des Nachweises von *C. albicans* mit dem Candida albicans RT-PCR Kit, IVD, beeinträchtigt. Alle Experimente wurden mit dem Applied Biosystems® QuantStudio™ 5 RT-PCR-Gerät durchgeführt.

Potenzielle Interferenzen	Name des Interferenten	Wirkstoff	Endkonzentration in Probe	Interferenz Ja (J) oder Nein (N)
Anti-Pilzmittel	Anidulafungin	Anidulafungin	5 mg/mL	N
Anti-Pilzmittel	Flucytosin	Flucytosin	5 mg/mL	N
Anti-Pilzmittel	Voriconazol	Voriconazol	5 mg/mL	N
Anti-Pilzmittel	Amphotericin B	Amphotericin B (20 µg/mL)	10% V/V	N
Antimikrobielle Mittel	Gino-Canesten	Clotrimazol (10 mg/g)	10% w/v	N
Antimikrobielle Mittel	Lomexin	Fenticonazolnitrat	10% w./V.	N
Arzneimittel	Progeffik	Progesteron	5 mg/mL	N
Waschen	Betadin 100 mg/mL	Povidon-Jod (100 mg/mL)	10% V/V	N
Waschen	Cien Gel Para Higiene Íntima	-	10% V/V	N
Waschen	Saugella Homme	Milchsäure	10% V/V	N
Waschen	Sabão azul e branco	-	10 mg/mL	N
Waschen	D'aveia Ginecológico	-	10% w./V.	N
Waschen	Palmolive Glicerina Natural	Natriumpalmat und Natriumoleat	10 mg/mL	N
Waschen	Palmolive Verwöhnendes Vergnügen (Palmolive Indulging Delight)	-	10 mg/mL	N
Waschen	Continente Gel Íntimo	-	10% V/V	N
Schmiermittel	Warm Up Cherry (Aufwärmen Kirsche)	-	10% V/V	N
Schmiermittel	Control - Thai Passion	-	10% V/V	N
Lokaltherapie Produkte	Lauroderme	Zinkoxid (23 mg/g) + Salicylsäure (2 mg/g)	10 mg/mL	N
Lokaltherapie Produkte	Bepanthene Pomada	Dexpanthenol (50 mg/g)	10% w./V	N
Lokaltherapie Produkte	Halibut	Zinkoxid (150 mg/g)	10% w./V.	N
Lokaltherapie Produkte	L-Mesitran Soft	40 % medizinischer Honig	10% w./V.	N
Lokaltherapie Produkte	Climacare - Gel Vaginal	Hyaluronsäure & Milchsäure	10% V/V	N
Lokaltherapie Produkte	Elixir de Argan Oil & Go	Paraffinum Liquidum	10% V/V	N
Lokaltherapie Produkte	WOMAN ISDIN Hidratante Vaginal	Glyzerin (11%)	10% V/V	N

Potenzielle Interferenzen	Name des Interferenten	Wirkstoff	Endkonzentration in Probe	Interferenz Ja (J) oder Nein (N)
Natürliche Inhibitoren	Sexuelle Flüssigkeiten	-	Schaben im Transportmedium	N
Natürliche Inhibitoren	Samenflüssigkeit	-	5% V/V	N
Natürliche Inhibitoren	Speichel	-	10% V/V	N
Natürliche Inhibitoren	Urin	-	10% V/V	N
Natürliche Inhibitoren	Vollblut	Glukose, Hormone, Enzyme, Ionen, Eisen usw.	10% V/V	N
Natürliche Inhibitoren	Schleim	Immunglobulin, Lysozym, Polymere	Schaben im Transportmedium	N
Natürliche Inhibitoren	Menstruation	-	Schaben im Transportmedium	N
Natürliche Inhibitoren	Plasma	-	10% V/V	N
Absolutes Ethanol	Ethanol	Alkohol	5% V/V	N

11.4 Präzision

Die Testpräzision für das Candida albicans RT-PCR Kit, IVD von NZYTech wurde durch wiederholtes Testen positiver Proben bestimmt, die zwei Erregerbelastungen repräsentieren, 3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion, die mit DANN aus negativen Vaginalproben versetzt wurden, wobei drei verschiedene Kit-Chargen und typische Testreaktionsbedingungen verwendet wurden. Die Präzision wurde durch Messung des Cq-Mittelwerts, des Cq-Variationskoeffizienten und des prozentualen Anteils der Wiederholungsdetektion bewertet, wie unten für jeden Fall beschrieben. Die Daten sind in der nachstehenden Tabelle wiedergegeben.

11.4.1. Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit wurde von einem Bediener durch die Analyse von 12 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion) bewertet, was einer endgültigen Anzahl von 24 durchgeführten Tests pro Ziel entspricht.

11.4.2. Tägliche Reproduzierbarkeit

Die tägliche Reproduzierbarkeit wurde von einem Bediener durch die Analyse von 48 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD-Kopien pro Reaktion) über 4 Tage hinweg bewertet, wobei 12 Wiederholungen jeder Konzentration pro Tag durchgeführt wurden (insgesamt wurden 96 Tests pro Ziel durchgeführt).

11.4.3. Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge

Die Reproduzierbarkeit zwischen den Chargen wurde von einem Anwender durch die Analyse von 72 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion) unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen mit 24 Wiederholungen pro Charge bewertet.

11.4.4. Operator-Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit durch den Bediener wurde bewertet, indem 36 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion) von drei verschiedenen Bedienern mit 12 Wiederholungen pro Bediener getestet wurden.

11.4.5. Reproduzierbarkeit zwischen den Instrumenten

Die Reproduzierbarkeit zwischen den Instrumenten wurde von einem Bediener durch Testen von 24 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion) in fünf verschiedenen qPCR-Instrumenten gemessen: Applied Biosystem® QuantStudio™ 5, Applied Biosystem® 7500, Applied Biosystem® StepOnePlus, Roche® LightCycler 96™ und Bio-Rad® CFX96™, in insgesamt 60 Tests pro Probe.

Präzision des Candida albicans RT-PCR Kits, IVD von NZYTech

Variable		***C. albicans* (Kopien/Reaktion)**	
		3x LoD	**30x LoD**
Wiederholbarkeit	N	12	12
	Mittlerer Cq	32.90	29.65
	Variationskoeffizient (%)	1.18	0.48
	% Replikat-Erkennung	100	100
Tägliche Reproduzierbarkeit	N	48	48
	Mittlerer Cq	32.85	29.65
	Variationskoeffizient (%)	1.41	0.56
	% Replikat-Erkennung	100	100
Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge	N	72	72
	Mittlerer Cq	32.91	29.66
	Variationskoeffizient (%)	1.45	0.56
	% Replikat-Erkennung	100	100
Operator-Reproduzierbarkeit	N	36	36
	Mittlerer Cq	33.00	29.66
	Variationskoeffizient (%)	1.4	0.53
	% Replikat-Erkennung	100	100
Reproduzierbarkeit zwischen Instrumenten	N	60	60
	Mittlerer Cq	32.47	29.04
	Variationskoeffizient (%)	2.06	1.23
	% Replikat-Erkennung	100	100

11.5 Klinische Bewertung

Die klinische Leistungsfähigkeit des Candida albicans RT-PCR Kits, IVD, von NZYTech wurde anhand von Vaginalproben in einem unabhängigen molekulardiagnostischen Labor bewertet. Als Vergleich diente eine mikrobiologische Routine-Kulturmethode. Insgesamt wurden 20 klinische Proben getestet, und zwar 10 negative und 10 positive klinische Proben für *Candida albicans*. Die Daten zeigten eine 100%ige Übereinstimmung für alle getesteten positiven und negativen Proben.

12. Qualitätskontrolle

Alle Komponenten des Candida albicans Echtzeit PCR Kits, IVD, von NZYTech werden gemäß den oben beschriebenen Protokollen getestet. Das Duplex qPCR-System ermöglicht den Nachweis von Zielgenen, die für die Identifizierung von *C. albicans*-DNA beschrieben sind, sowie von menschlicher DNA (*β-Aktin*-Gen, *ACTB*). Positive Amplifikationen werden für die Zielgene, die Positivkontrolle und die internen Kontrollen über FAM- und HEX/JOE/VIC-Kanäle entsprechend der jeweiligen Primer/Sondensatz-Reporterfarbstoffen beobachtet.

13. Technische Unterstützung

Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte an unser engagiertes technisches Support-Team unter der Telefonnummer: +351 (0) 21 364 35 14 oder E-Mail: info@nzytech.com.

14. Warenzeichen und Haftungsausschlüsse

Alle Marken, die in diesem Handbuch erscheinen, sind Eigentum der jeweiligen Inhaber.

15. Erläuterung von Symbolen

IVD	*In-vitro*-diagnostisches Medizinprodukt		Gebrauchsanweisung beachten
REF	Katalognummer		Hersteller
LOT	Chargen-Code		Verwendet von
	Temperaturgrenzen		Ausreichend für
CONTROL +	Positivkontrolle		Vor Sonnenlicht fernhalten (Primer/Sonden Mix)
CONTROL –	Negativkontrolle		

16. Konformitätserklärung

Produktname: Candida albicans RT-PCR-Kit, IVD

Katalognummer: MD04891

Verwendungszweck: Qualitativer *Candida albicans* Nachweis.

Hersteller: NZYTech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lissabon

Portugal

Wir, NZYTech, Lda – Genes & Enzymes, erklären hiermit, dass dieses Produkt, auf das sich diese Konformitätserklärung bezieht, mit den folgenden Norm und anderen normativen Dokumenten ISO 9001:2015 gemäß den Bestimmungen der Richtlinie 98/79/EG und der Verordnung (EU) 2017/746 über *In-vitro*-Diagnostika, wie sie in nationales Recht der Mitgliedstaaten der Europäischen Union umgesetzt wurde, konform ist.

Die technische Produktakte wird bei NZYTech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar – Edifício E, R/C, 1649-038 Lissabon, Portugal, gepflegt.

Joana Brás, PhD

Technische Direktorin

17. Referenzen

Silva Dantas, A., Lee, K. K., Raziunaite, I., Schaefer, K., Wagener, J., Yadav, B., & Gow, N. A. (2016). Zellbiologie der Wechselwirkungen zwischen Candida albicans und Wirt. Aktuelle Meinung in der Mikrobiologie, 34, 111-118.

Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). Candida albicans-Biologie, molekulare Charakterisierung, Pathogenität und Fortschritte in Diagnose und Kontrolle – Ein Update. Microbial pathogenesis, 117, 128-138.

Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulenzfaktoren von Candida albicans. Trends in der Mikrobiologie, 9(7), 327-335.

https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/. Zugriffsdatum: 13 / 01/ 2022.

Kozel, T. R., & Wickes, B. (2014). Pilzdiagnostik. Perspektiven von Cold Spring Harbor in der Medizin, 4(4), a019299.

nzytech
genes & enzymes

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lissabon, Portugal
Tel.:+351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com