Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD

Kit de PCR em tempo real para Candida albicans, IVD

REF MD04891, 96 reações

***Dispositivo médico para diagnóstico* in vitro**

CE IVD

PT

Instruções de utilização

IM-008pt

VERSÃO 02/2022, dezembro 2022

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

Índice

1. Introdução 3
2. Utilização prevista 3
3. Princípio do ensaio 4
4. Descrição do produto 5
5. Armazenamento, conservação e manuseamento 5
6. Materiais e instrumentos necessários mas não fornecidos 5
7. Colheita e preparação da amostra 6
8. Advertências e precauções 6
   8.1 Informação de segurança 6
   8.2 Manuseamento e Procedimentos adequados 6
9. Procedimentos de testagem 7
   9.1 Preparação das reações de qPCR 7
   9.2 Programação do equipamento de PCR em tempo real 8
10. Análise de dados 9
   10.1 Critérios de validação da corrida 9
   10.2 Interpretação dos resultados 9
11. Avaliação de desempenho do teste 11
   11.1 Resultados esperados 11
   11.2 Sensibilidade Analítica – Limite de Deteção (LoD) 11
   11.3 Inclusividade, Reatividade Cruzada e Substâncias Interferentes 12
   11.4 Precisão 15
      11.4.1. Repetibilidade 15
      11.4.2. Repetibilidade diária 15
      11.4.3. Reprodutibilidade entre lotes 15
      11.4.4. Reprodutibilidade entre operadores 15
      11.4.5. Reprodutibilidade entre equipamentos 15
   11.5 Avaliação Clínica 15
12. Controlo de Qualidade 16
13. Apoio Técnico 16
14. Marcas registadas e direitos de propriedade 16
15. Tabela de símbolos 17
16. Declaração de Conformidade 18
17. Referências 19

1. Introdução

Candida albicans é um fungo diploide, unicelular, que naturalmente coloniza o trato intestinal humano em cerca de 80% da população. *C. albicans* é, contudo, uma levedura oportunista que pode causar infeções orais e genitais. A infecção é acompanhada por uma alteração morfológica do organismo unicelular para uma forma filamentosa multicelular patogénica. Na forma comensal, o fungo vive no trato gastrointestinal e o crescimento é regulado por outros microrganismos, bem como pelo sistema imunológico do hospedeiro. A mudança entre as formas comensal e patogénica, conhecida como comutação fenotípica, pode ser regulada pela expressão génica diferencial coordenada por vários fatores de transcrição. Em última análise, a mudança fenotípica para a forma multicelular permite a penetração da membrana mucosa a partir da qual inicia a infeção. A infeção por *C. albicans* causa candidíase, que pode ser superficial ou sistémica, quando se torna uma doença com risco de vida. As infeções superficiais causam sintomas como coceira e irritação, que geralmente podem ser eliminados com recurso a medicamentos antifúngicos. No entanto, indivíduos com um sistema imunológico enfraquecido ou com diabetes têm um risco aumentado de desenvolver infeção. Quando ocorre um crescimento excessivo, pode levar a infeções do trato urinário, infeções fúngicas genitais, candidíase oral e candidíase mucocutânea. Nos casos mais graves, quando a *C. albicans* entra na corrente sanguínea ou nos órgãos, pode levar a perda de visão, infeções do sangue e dos ossos, endocardite, meningite ou inflamação do revestimento intra-abdominal. O PCR em tempo real é o método mais rápido e confiável para realizar um diagnóstico preciso da infeção por *C. albicans*.

2. Utilização prevista

O kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, é um teste molecular baseado na tecnologia de PCR em tempo real, destinado à rápida deteção e diagnóstico qualitativo dos ácidos nucleicos patógénicos definidos para amostras biológicas humanas. A utilização do kit é indicada em pacientes com sintomatologia inflamatória do trato vaginal, para diagnóstico e controle de infeção causada por *C. albicans*. A aplicação do kit não depende de aspetos populacionais e demográficos. Não existem contraindicações para usar o kit de deteção de PCR em tempo real de *C. albicans*. No entanto, este teste serve como complemento ao diagnóstico e o seu resultado deverá ser combinado com os sinais clínicos e sintomas de infeção fúngica. Assim, um resultado positivo indica a presença de ADN de *C. albicans*, mas a correlação clínica da anamnese e outras informações de diagnóstico são necessárias para determinar o estado de infeção do paciente. Um resultado negativo não exclui a existência de *C. albicans* e não deve ser adotado como único instrumento para a decisão de tratamento do paciente. A testagem deve ser realizada por técnicos de laboratório especializados e qualificados, sobretudo na técnica de PCR em tempo real e em diagnóstico molecular *in vitro*. As amostras clínicas adequadas incluem zaragatoas de células epiteliais vaginais. O kit deverá ser usado apenas conforme indicado neste manual do utilizador.

3. Princípio do ensaio

O kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech fornece o conjunto de reagentes, enzimas e oligonucleótidos (*primers* e sondas) para a deteção qualitativa do genoma de *C. albicans*, através da técnica de PCR em tempo real (ver requisitos das especificações do equipamento na Secção 6). A sequência alvo do kit localiza-se no gene RPR1 que foi previamente identificado como um bom marcador genético para *C. albicans*. O kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD da NZYTech foi constituído para ter um amplo perfil de deteção possível, mas permanecendo específico para o genoma de *C. albicans*. Os *primers* e sondas do kit têm 100% de homologia com 100% das sequências de *C. albicans* disponíveis no banco de dados GenBank (novembro, 2022). Além disso, o conjunto de oligonucleótidos foi desenhado especificamente para deteção deste organismo, não apresentando homologia significativa com outros genomas, o que traduz a elevada especificidade e sensibilidade de deteção do teste, já que evita a deteção cruzada de outros organismos causadores de infeções vaginais. O controlo interno, incluído no kit, permite confirmar se a extração dos ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas humanas foi eficiente, assim como, confirmar a ausência de inibidores de PCR que possam influenciar a reação de amplificação. A NZYTech revisita periodicamente a sequência do gene alvo de *C. albicans* e, caso seja necessário, poderá disponibilizar uma nova versão deste kit. Adicionalmente, o kit inclui dois controlos externos (um controlo positivo e um controlo negativo), tal como descrito adiante. O controlo positivo consiste em fragmentos de ácidos nucleicos que contêm as duas sequências alvo detetadas pelo kit (gene fúngico RPR1 e gene humano da β-actina).

Neste kit, a determinação qualitativa de ADN é baseada na técnica de PCR em tempo real, que é metodologia de referência no diagnóstico laboratorial. É uma metodologia de elevada sensibilidade e especificidade para detetar com exatidão a presença deste organismo. O kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech, tem como príncipio a pesquisa da presença do ADN do fungo da Candida, isolado e purificado através de um sistema de extração. O ADN extraído é sujeito a um processo de amplificação por PCR, numa única reação, através de um conjunto de oligonucleótidos altamente específicos para o fungo a detetar e baseados no princípio TaqMan®. Na presença de ADN de *C. albicans*a sonda TaqMan® liga-se especificamente a regiões conservadas do gene RPR1 que se encontra flanqueada por dois pares de oligonucleótidos igualmente específicos. Um segundo conjunto de oligonucleótidos (*primers* e sonda) funciona como controlo interno, detetando o gene humano da β-actina (ACTB), que permite confirmar a eficácia do processo de extração do material biológico recolhido do paciente. Adicionalmente, o controlo interno permite demonstrar se ocorreu ou não inibição da reação pela presença/ausência de inibidores de PCR nas amostras clínicas. Para permitir a identificação da amplificação dos dois alvos específicos numa única reação, as sondas específicas para *C. albicans* e β-actina humana são marcadas com fluoróforos emissores diferentes, FAM™ e HEX™, respetivamente. Assim, este kit consiste num ensaio duplex onde o alvo específico para C. Albicans é detecado no canal ótico FAM e o gene alvo humano é detectado no canal ótico HEX. Estes conjuntos de oligonucleótidos/sondas são fornecidos em concentrações otimizadas para garantir que a amplificação do ADN humano, mesmo quando presente em concentrações extremamente altas, não limita a eficiência dos conjuntos de primers/sonda de *C. albicans*.

4. Descrição do produto

O kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech fornece um conjunto de reagentes e controlos suficientes para realizar 96 reações de qPCR num único passo.

Composição do kit		Volume (por tubo)	Número de tubos
C. albicans MMix	NZYSupreme qPCR Probe Master Mix (2x)	1050 µL	1
C. albicans PPMix	C. albicans/ACTB primers/probe Mix	205 µL	1
C. albicans POS	C. albicans/ACTB Positive Control	105 µL	1
NTC	No-Template Control	105 µL	1

5. Armazenamento, conservação e manuseamento

O envio do kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, é enviado refrigerado. Após receção do kit, todos os componentes devem ser imediatamente armazenados de -85°C a -15°C. Quando estão a ser utilizados, os componentes do kit devem ser colocados prontamente no congelador depois da sua utilização, de forma a minimizar o tempo de exposição à temperatura ambiente. Atender ainda a:

- É aconselhável reduzir o número dos ciclos de congelação/descongelação através do armazenamento de alíquotas de trabalho. Se apropriado, os componentes do kit podem ser aliquotados em volumes menores após descongelação.
- O componente C. albicans PPMix deve ser armazenado num local protegido da luz. Em particular, não expor o componente NZYSupreme qPCR Probe Master Mix (2x) diretamente à luz do sol depois de adicionar o componente C. albicans PPMix.
- Se ao receber o kit, a embalagem estiver danificada, contactar imediatamente a NZYTech.
- Tenha em atenção a data de validade indicada na embalagem. A NZYTech não recomenda a utilização do kit após a data de validade. Nessa altura, o kit deve ser descartado seguindo as instruções descritas na **Secção 8.2.**

6. Materiais e instrumentos necessários mas não fornecidos

- Equipamento de PCR em tempo real que deteta os canais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos FAM e HEX/JOE/VIC (canais de comprimento de onda de 520 e 556 nm, respetivamente); e acessórios fornecidos pelo fabricante. Ver na **Secção 11** os modelos dos equipamentos em que o kit foi validado.
- Consumíveis, reagentes e equipamento para extração de ADN de amostras biológicas/clínicas.
- Consumíveis de plástico para qPCR, isentos de nucleases: tubos de PCR de 1.5 ou 2 mL, tubos e tampas de tiras de 0.1 ml, placas de 96 poços, peliculas adesivas.
- Pipetas e respetivas pontas com filtro hidrófobos, estéreis e livres de nucleases, resistentes a aerossóis.
- Luvas descartáveis.
- Agitador vórtex e centrífuga de bancada.

7. Colheita e preparação da amostra

O kit foi projetado para detetar DNA extraído a partir de zaragatoas vaginais. Diferentes fatores, tais como, o procedimento de colheita de amostras biológicas, o transporte, o armazenamento e a duração do tempo de processamento da amostra, são críticos para assegurar a integridade da amostra e atingir os resultados ótimos. As amostras recolhidas devem ser testadas o mais rapidamente possível. A colheita, o manuseamento e/ou o transporte inadequados das amostras poderão originar um resultado falso. Os ácidos nucleicos extraídos constituem o material inicial para o ensaio usando o teste Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD. A NZYTech recomenda a utilização do kit NZY Plant/Fungi gDNA Isolation kit (MB177, NZYTech), para a extração dos ácidos nucleicos, uma vez que este kit foi validado para a extração de amostras de C. albicans.
Por favor, assegure-se de que as amostras de ADN são adequadas em termos de pureza, concentração e integridade dos ácidos nucleicos. Uma vez que o etanol é um forte inibidor do PCR em tempo real, é necessário eliminar completamente este componente antes da eluição dos ácidos nucleicos aquando de processo de extração. O kit da NZYTech contém um controlo interno que tem como alvo o ADN humano co-purificado com o ADN da *C. albicans*. O ADN humano é amplificado com o conjunto de oligonucleotídeos (*primers* e sonda) do gene da β-actina humana. A introdução do controlo interno é útil na avaliação da eficiência da extração e isolamento do ADN e/ou na deteção da presença de potenciais inibidores durante o processamento da amostra.

8. Advertências e precauções

Siga cuidadosamente os procedimentos e indicações fornecidas neste manual de forma a assegurar que o teste é realizado corretamente. Antes da primeira utilização verifique o produto e os seus componentes relativamente a integridade, totalidade e tipo de componentes do kit, etiquetagem correta e se congelado aquando entrega. Como em qualquer procedimento de testagem, as boas práticas de laboratório são essenciais. Qualquer alteração das mesmas pode resultar na falha do ensaio ou causar resultados erróneos. Devido à elevada sensibilidade do kit, deve ser dada especial atenção aos reagentes e às misturas de amplificação da reação, de forma a mantê-los livres de contaminações.

8.1 Informação de segurança

Antes de utilizar o kit, por favor consulte a ficha de dados de segurança (SDS) que está disponível no *website* da NZYTech (www.nzytech.com). A deteção deste kit deve ser realizada somente por profissionais especializados com formação nos procedimentos técnicos e nas normas de segurança, em laboratórios devidamente equipados. Os regulamentos internacionais e nacionais de biossegurança de laboratórios devem ser seguidos em todas as circunstâncias.

8.2 Manuseamento e Procedimentos adequados

- Apenas para uso profissional de diagnóstico *in vitro*.
- Não utilizar este kit após a data de validade.
- Não utilizar os componentes do kit se a embalagem estiver danificada.
- Não misturar reagentes/componentes de diferentes lotes de produção.
- Não utilizar reagentes/componentes de outros fabricantes juntamente com os reagentes/componentes deste kit.

- Devem ser usados consumíveis de plástico e pipetas livres de nucleases (sem DNase/RNase) em todos os procedimentos.
- Utilize áreas de trabalho separadas/diferentes e isoladas para: a preparação da amostra, a preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente. Se possível mude de bata.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.
- As amostras biológicas devem ser manuseadas como sendo infeciosas e seguindo as precauções de biossegurança adequadas.
- O controlo positivo contém um elevado número de cópias; deve ser guardado e manuseado longe das amostras e dos todos os outros componentes do kit de forma a evitar contaminação cruzada.
- Utilizar sempre o controlo negativo fornecido no kit (NTC).
- Manusear as placas após amplificação com cuidado e descartá-las imediatamente no final da testagem; as placas devem ser sempre descartadas no contentor de riscos biológicos.
- No final de cada testagem, limpar/desinfetar as superfícies das zonas de trabalho e equipamentos com solução desinfetante apropriada para remoção de quaisquer vestígios de ácidos nucleicos.
- Deitar fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as normas regulamentares de segurança em vigor. Resíduos de compostos químicos e outras preparações são geralmente considerados resíduos perigosos. A rejeição deste tipo de resíduos está regulada por leis nacionais e regionais.
- Todos os resultados devem ser interpretados por um profissional de saúde no contexto do historial médico e sintomas do paciente.
- Este teste não pode excluir doenças causadas por outros patógenos.
- Um resultado negativo para qualquer teste de PCR não exclui a possibilidade de infeção.
- Seguir boas práticas de laboratório, vestir roupa de proteção, usar luvas permanentemente, óculos de proteção e máscara. Não comer, beber ou fumar na zona de trabalho.

9. Procedimentos de testagem

Por favor, leia cuidadosamente as instruções antes de realizar o ensaio. Tenha em atenção que os passos de pipetagem e preparação da placa devem ser feitos em gelo. Depois da placa estar selada, deve-se iniciar imediatamente o protocolo de PCR em tempo real. A exposição prolongada de misturas da reação à temperatura ambiente pode levar a artefactos de PCR que reduzem a sensibilidade da deteção. Antes de iniciar a preparação do ensaio, deve misturar gentilmente os tubos de reação fornecidos, centrifugar por cinco segundos para recolher o conteúdo no fundo do tubo e colocar em gelo. **Recomendamos vivamente pipetar sempre em último lugar o controlo positivo do kit, C. albicans POS, de forma a evitar contaminações cruzadas.**

9.1 Preparação das reações de qPCR

1. Preparar uma mistura de reação qPCR com o volume suficiente para o número de testes a realizar, com 5% de volume extra para compensar perdas durante a pipetagem. Proceda de

acordo com a tabela seguinte, onde estão especificados os volumes para 1 ou *n* testes (em que *n* corresponde ao número total de reações):

Componente	**Volume 1 teste (µL)**	**Volume *n* testes (*) + 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**

(*) Para calcular o número total de reações necessárias para cada ensaio, contabilize o número de amostras e mais duas para os controlos negativo e positivo, respetivamente.

2. Pipete 12 µL da mistura reação qPCR para cada poço de acordo com a configuração de testagem da placa de qPCR.

3. Para o controlo negativo, adicione 8 µL de NTC no poço relativo ao controlo negativo, em substituição do ADN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.

4. Para as amostras biológicas, adicione 8 µL de cada amostra de ADN nos poços relativos ao ensaio, de acordo com a configuração de testagem da placa. O volume final deve ser de 20 µL.

5. Para o controlo positivo, adicionar 8 µL de C. albicans POS em substituição do ADN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.

6. Selar a placa contendo todas a reações com um revestimento adesivo apropriado antes de iniciar as etapas de qPCR em tempo real para deteção das sequências.

7. Colocar a placa no equipamento de PCR em tempo real e iniciar o protocolo de qPCR de acordo com a secção seguinte.

9.2 Programação do equipamento de PCR em tempo real

A tabela seguinte exemplifica o protocolo padronizado e otimizado num determinado número de plataformas de PCR em tempo real. Estas condições podem, contudo, ser adaptadas e validadas de forma a satisfazer protocolos específicos em alguns equipamentos.

Ciclos	**Temperatura**	**Tempo**	**Fase**
1	95 °C	3 min	*Ativação da polimerase*
40	95 °C	5 s	*Desnaturação*
	60 °C	30 s	*Emparelhamento/Extensão**

**Dependendo do instrumento de qPCR selecionar os canais de deteção adequados. Colheita de sinal de fluorescência nos canais FAM e HEX/JOE/VIC .*

Os corantes fluorescentes usados neste kit e respetivos canais de deteção são:

Fluoróforos/Marcações

Genes Alvo /Detetor	**Corante *Reporter* (Sondas)**	**Canal de deteção**
Gene específico de *C. albicans* (RPR1)	FAM™	FAM
Gene humano β-actina (ACTB)	HEX™	HEX/JOE/VIC
C. albicans POS	FAM™ & HEX™	FAM & HEX/JOE/VIC

O kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech foi validado nos seguintes equipamentos de PCR em Tempo Real: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche Life Science LightCycler® 480 II e Bio-Rad® CFX96™. Se pretender usar outro equipamento, o kit deverá ser validado pelo utilizador usando amostras previamente caracterizadas (positivas e negativas).

10. Análise de dados

10.1 Critérios de validação da corrida

Previamente à análise dos resultados, recomendamos veificar se o teste de PCR em tempo real é válido. Assim, para cada placa, confirme se os resultados obtidos para os controlos positivos e negativo estão em acordo com os seguintes critérios:

- **Controlo positivo**: as curvas de amplificação para FAM (*C. albicans*) e HEX (ACTB) são positivas. É expectável que o controlo positivo origine curvas de amplificação com 20<Ct<25 , para qualquer um dos canais FAM e HEX. O não cumprimento deste critério de controlo de qualidade é uma forte indicação de que o ensaio foi comprometido.

- **Controlo negativo (reação sem ADN):** nenhum sinal de amplificação é detetado. Se o controlo negativo origina algumas das curvas de amplificação (FAM e HEX) com forma sigmoide, poderá ter ocorrido contaminação. Repita o teste seguindo boas práticas de PCR em tempo real.

Se os controlos estão de acordo com o esperado, o teste é considerado **válido**.
Por favor, proceda com a interpretação dos resultados das amostras testadas.

Se em algum dos controlos ou em ambos não foi obtido o resultado esperado, isto significa que o ensaio foi comprometido ou executado incorretamente, devendo ser considerado **inválido**. **Por favor, repita o teste.** Se o problema persistir, contacte o fabricante.

10.2 Interpretação dos resultados

***C. albicans* é detetado** se a curva de amplificação do FAM é sigmoide com Ct≤36, independentemente do resultado obtido para o gene ACTB (HEX).

***C. albicans* não é detetado** se a curva do canal FAM® não for positiva (Ct>36), enquanto o gene ACTB (HEX) apresenta uma curva positiva sigmoide com Ct≤40.

O **teste é inválido** se as curvas de amplificação de *C. albicans* e ACTB forem negativas. O teste deve ser repetido, procedendo-se a nova extração de ácidos nucleicos a partir da amostra.

A tabela seguinte resume a interpretação dos resultados principais (deve avaliar a forma das curvas de amplificação; **apenas curvas de amplificação sigmoide são indicativas de uma amplificação real)**.

C. albicans (FAM)	**ACTB** (HEX)	**Interpretação dos resultados**
+ (Ct≤36)	+ (Ct≤40)	*C. albicans* → **POSITIVO**
+ (Ct≤36)	- (Ct>40)*	*C. albicans* → **POSITIVO**
- (Ct>36)	+ (Ct≤40)	*C. albicans* não detetado → **NEGATIVO**
- (Ct>36)	- (Ct>40)	Teste inválido, repetir extração de ADN e realizar nova corrida

* *Não é necessária a deteção do controlo interno no canal de deteção HEX para resultados positivos no canal de deteção FAM. Quantidades elevadas de ADN alvo na amostra podem originar a redução ou ausência do sinal de controlo Interno.*

Nota: A interpretação dos resultados deve ter em conta a possibilidade de resultados falsos negativos e falsos positivos.

• Resultados falsos negativos podem ser causados por:

- Recolha transporte, manuseamento e/ou armazenamento incorretos das amostras.
- Degradação da amostra.
- Presença de inibidores de qPCR.
- Mutações no genoma do organismo patogénico.
- Falha no seguimento dos procedimentos deste manual.
- Utilização de kits de extração ou plataformas de PCR em tempo real não validadas.

• Resultados falsos positivos, podem ser causados por:

- Contaminação cruzada de amostras contendo elevadas concentrações de ADN de *C. albicans*
- Manuseamento incorreto do controlo positivo C. albicans POS.
- Manuseamento incorreto do produto amplificado (placa pós amplificação).

Um resultado negativo não impede a infeção por *C. albicans* e não deve ser usado como único indicador para o tratamento médico ou outras decisões relativas ao paciente. Além disso, este teste não pode descartar doenças causadas por outros patógenos.

11. Avaliação de desempenho do teste

O desempenho do kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech foi validado nos equipamentos de PCR em tempo real Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5 e Bio-Rad® CFX96™. Se outro equipamento for usado, o kit deverá ser validado pelo utilizador utilizando amostras positivas e negativas previamente caracterizadas.

11.1 Resultados esperados

Um gráfico típico de amplificação referente a uma amostra clínica positivapara *C. albicans* encontra-se apresentado na Figura 1. Em situações em que a amostra contém quantidades elevadas de ADN de *C. albicans* a curva do canal HEX™/VIC®, correspondente ao gene humano da β-actina, pode estar ausente ou exibir uma forma atípica.

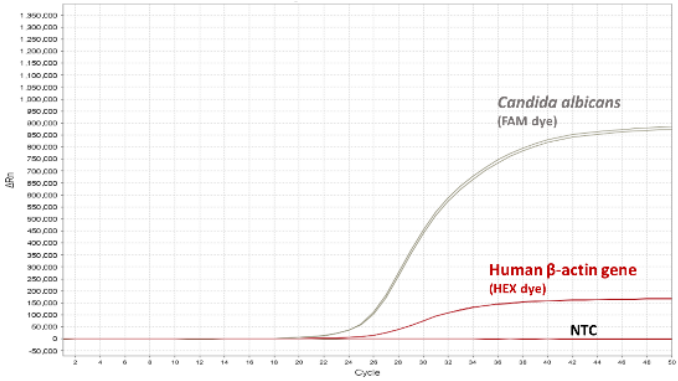

Figura 1. Deteção simultânea das sequências dos genes-alvo de *C. albicans* e da β-actina humana (ACTB) numa amostra clínica positiva. Curva cinzenta: deteção da sequência alvo de *C. albicans* (gene RPR1) através do canal FAM. Curva vermelha: deteção da sequência da β-actina humana (ACTB) através do canal HEX. NTC controlo negativo.

11.2 Sensibilidade Analítica – Limite de Deteção (LoD)

A sensibilidade analítica foi definida como a concentração limitante do analito que pode ser detetado com 95% de confiança. Este parâmetro foi avaliado através de ensaios com diferentes números de cópias (todas diluições limitantes) dos ácidos nucleicos da *C. albicans*, misturadas com ADN extraído de amostras negativas vaginais, usando 3 lotes de kit diferentes e seguindo as condições de reação recomendadas. Os testes foram repetidos durante 4 dias, produzindo 48 réplicas para cada concentração testada. A análise conjunta dos dados revelou que o kit deteta5 copias/reação ou 0,250 copias/µL de *C. albicans* com uma confiança ≥95%. Assim, a sensibilidade analítica do kit, expressa como o Limite de Deteção (LoD), é de 250 cópias/mL para *C. albicans*.

Os diferentes LoDs foram confirmados por dois operadores usando os 3 lotes de kit num ensaio de 96 réplicas, assegurando-se assim que a sensibilidade analítica se mantém em diferentes condições de testagem. O estudo do LoD estabeleceu qual a menor concentração de C. *albicans* (número de cópias/mL) que pode ser detetada pelo kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD

em, pelo menos, 96% dos casos. Todos os ensaios foram realizados no equipamento Applied Biosystem® QuantStudio™ 5 Real-Time PCR e a análise foi realizada usando o software do próprio equipamento.

Por fim, a capacidade do kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, para detectar o agente patogénico em diferentes concentrações foi determinada, testando diferentes quantidades de ácidos nucleicos em condições de teste padrão. A Figura 2 mostra as curvas de amplificação para as diferentes quantidades de ácidos nucleicos.

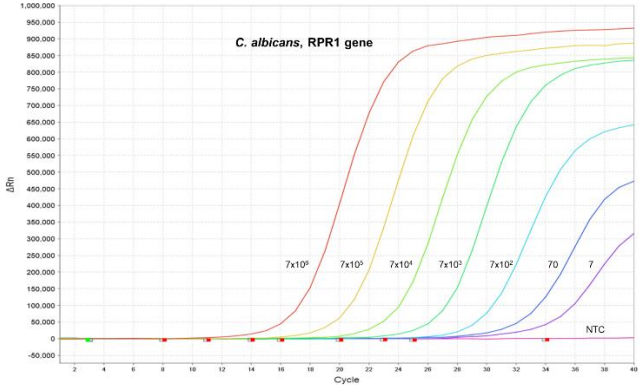

Figura 2. Sensibilidade do kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD. Gráfico de amplificação (número de ciclos versus fluorescência - ΔRn) de diluições seriadas 1:10, de 7 x 10^6 cópias a 7 cópias por reação, do ADN de C. albicans através do canal FAM. NTC, controlo negativo.

11.3 Inclusividade, Reatividade Cruzada e Substâncias Interferentes

A inclusividade e a reatividade cruzada foram avaliadas por análise *in silico* em comparação com patógenos evolutivamente próximos *C. albicans*, e com patógenos que causam infeções com sintomas semelhantes, respetivamente. A análise *in silico* (simulação computacional) indica que amplificação de sequências não-alvo que resultam em reatividade cruzada ou que podem interferir potencialmente na deteção de *C. albicans* não é provável.

Os ensaios *in vitro* para reatividade cruzada (exclusividade) foram realizados para confirmar que o kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD não reage com outros microrganismos colonizadores e patogénicos comumente encontrados em amostras clínicas humanas do trato vaginal. Este estudo foi realizado usando um painel comercial de patógenos vaginais comercializados pela empresa ZeptoMetrix®, nomeadamente o *NATtrol™* Vaginal Panel® (#NATVP-BD). Este painel inclui amostras representativas de espécimes clínicos verdadeiros, de origem bacteriana e fúngica, incluindo *Atopobium vaginae* Z242, *Candida albicans* Z006, *Gardnerella vaginalis* Z247, *Lactobacillus crispatus* Z246, *Trichomonas vaginalis* Z070 e BVAB2 Recombinant. Os resultados obtidos, utilizando três lotes diferentes do kit, confirmaram que, com exceção da *C. albicans* que é expetavelmente identificada pelo kit, nenhum dos microrganismos testados interferiu no desempenho do kit, não tendo originado uma amplificação de sinal detetável como um resultado falso positivo ou como um sinal inespecífico.

Adicionalmente, o kit foi testado para a amplificação de ácidos nucleicos de outros microrganismos comuns do trato vaginal, incluindo *Actinomyces naeslundii, Candida glabrata, Candida tropicalis, Chlamydia trachomatis, Gardnerella vaginalis, Lactobacillus acidophilus, Mesomycoplasma lagogenitalium, Mycoplasma hominis, Neisseria gonorrhoeae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus sp. e Veillonella párvula* (comercializados pela empresa *Leibniz-Institut DSMZ).* Os resultados obtidos, utilizando três lotes diferentes do kit, confirmaram que nenhum dos microrganismos testados interferiu no desempenho do kit, não tendo originado uma amplificação de sinal detetável como um resultado falso positivo ou como um sinal inespecífico. Assim sendo, considerando os organismos testados, o kit apresenta uma especificidade analítica de 100%.

A interferência por possíveis substâncias encontradas em amostras vaginais na sensibilidade de deteção pelo kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, foi avaliada num ensaio usando 33 potenciais substâncias interferentes (ver tabela em baixo). Neste estudo foram utilizadas amostras artificiais misturadas com amostras vaginais com *C. albicans*. As amostras artificiais foram preparadas adicionando ADN de *C. albicans* na concentração 3x LoD a uma matriz clínica negativa tendo sido também preparada uma amostra controlo sem *C. albicans*. As substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas às amostras artificiais em concentrações que representam os níveis mais elevados esperados em amostras vaginais com base na revisão da literatura. Foi também incluído um controlo negativo utilizando-se água como substância adicionada. Os resultados demonstraram nenhuma das substâncias testadas interferem na sensibilidade de deteção da *C. albicans* pelo kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD. Todas as experiências realizaram-se no equipamento de PCR em tempo real Applied Biosystems® QuantStudio™ 5.

Potencial Interferente	Nome do Interferente	Ingrediente Activo	Concentração final na amostra	Interferente Sim (S) ou Não (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-Canesten	Clotrimazol (10 mg/g)	10% w/v	N
Antimicrobianos	Lomexin	Nitrato de Fenticonazol	10% w/v	N
Medicamento	Progeffik	Progesterona	5 mg/mL	N
Produtos de lavagem	Betadine 100 mg/mL	Iodo povidona (100 mg/ml)	10% v/v	N
Produtos de lavagem	Cien Gel Para Higiene Íntima	-	10% v/v	N
Produtos de lavagem	Saugella Homme	Ácido láctico	10% v/v	N
Produtos de lavagem	Sabão azul e branco	-	10 mg/mL	N
Produtos de lavagem	D'aveia Ginecológico	-	10% w/v	N

Potencial Interferente	Nome do Interferente	Ingrediente Activo	Concentração final na amostra	Interferente Sim (S) ou Não (N)
Produtos de lavagem	Palmolive Glicerina Natural	Palmato de Sódio e Oleato de Sódio	10 mg/mL	N
Produtos de lavagem	Palmolive Indulging Delight	-	10 mg/mL	N
Produtos de lavagem	Continente Gel Íntimo	-	10% v/v	N
Lubricantes	Warm Up Cherry	-	10% v/v	N
Lubricantes	Control - Thai Passion	-	10% v/v	N
Produtos tópicos	Lauroderme	Óxido de zinco (23mg/g) + Ácido salicílico (2mg/g)	10 mg/mL	N
Produtos tópicos	Bepanthene Pomada	Dexpantenol (50 mg/g)	10% w/v	N
Produtos tópicos	Halibut	Óxido de zinco (150mg/g)	10% w/v	N
Produtos tópicos	L-Mesitran Soft	40% mel de grau médico	10% w/v	N
Produtos tópicos	Climacare - Gel Vaginal	Ácido hialurônico e ácido lático	10% v/v	N
Produtos tópicos	Elixir de Argan Oil & Go	Parafina Líquida	10% v/v	N
Produtos tópicos	WOMAN ISDIN Hidratante Vaginal	Glicerina (11%)	10% v/v	N
Inibidores naturais	Fluidos Sexuais	-	Colheita em meio de transporte	N
Inibidores naturais	Fluidos seminais	-	5% v/v	N
Inibidores naturais	Saliva	-	10% v/v	N
Inibidores naturais	Urina	-	10% v/v	N
Inibidores naturais	Sangue	Glucose, Hormonas, Enzimas, Iões, Ferro, etc	10 % v/v	N
Inibidores naturais	Muco	Imunoglobulina, Lisozima, Polímeros	Colheita em meio de transporte	N
Inibidores naturais	Menstruação	-	Colheita em meio de transporte	N
Inibidores naturais	Plasma	-	10 % v/v	N
Etanol absoluto	Etanol	Álcool	5% v/v	N

11.4 Precisão

A precisão do ensaio do kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD da NZYTech foi determinada pela testagem repetida de ácidos nucleicos individuais da *C. albicans* representativos de duas quantidades de patógeno, 3x LoD e 30x LoD por reação, combinadas com ADN extraído de amostras biológicas negativas vaginais, utilizando-se 3 lotes de kit e seguindo as condições de reação específicas. A precisão foi expressa através da média de Cq, do coeficiente de variação Cq e da percentagem (%) de deteção dos replicados, conforme descrito de seguida para cada caso. Os dados encontram-se resumidos na tabela apresentada abaixo.

11.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada por um operador através da análise de 12 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), contabilizando um total de 24 testes executados.

11.4.2. Repetibilidade diária

A repetibilidade diária foi avaliada por um operador através da análise de 48 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), durante 4 dias, com 12 réplicas por cada concentração por dia (contabilizando um total de 96 reações).

11.4.3. Reprodutibilidade entre lotes

A reprodutibilidade entre lotes foi avaliada por um operador através da análise de 72 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), usando 3 lotes diferentes do kit com 24 réplicas por cada lote.

11.4.4. Reprodutibilidade entre operadores

A reprodutibilidade entre operadores foi avaliada pela testagem de 36 réplicas de cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), por três operadores, num total de 12 testes por operador.

11.4.5. Reprodutibilidade entre equipamentos

A reprodutibilidade entre equipamentos foi avaliada por um operador através da testagem de 24 réplicas por cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), em cinco equipamentos de PCR em tempo real diferentes: Applied Biosystem® QuantStudio™ 5, Applied Biosystem® 7500, Applied Biosystem® StepOnePlus, Roche® LightCycler 96™ e Bio-Rad® CFX96™, num total de 60 testes por amostra.

11.5 Avaliação Clínica

A avaliação do desempenho do Kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech, foi avaliada usando amostras vaginais, num laboratório de diagnóstico molecular externo. Os resultados foram comparados com os obtidos por cultura microbiológica de rotina. No total, 20 amostras clínicas foram testadas, das quais: 10 amostras negativas e 10 amostras positivas para *Candida albicans*. Os resultados revelaram uma concordância de 100% para as amostras positivas e negativas analisadas.

Precisão do kit NZYTech's Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD.

Variável testada		*C. albicans* (cópias/reação)	
		3x LoD	**30x LoD**
Repetibilidade	n	12	12
	Média Cq	32,90	29,65
	Coeficiente de Variação (%)	1,18	0,48
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade diária	n	48	48
	Média Cq	32,85	29,65
	Coeficiente de Variação (%)	1,41	0,56
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade entre lotes	n	72	72
	Média Cq	32,91	29,66
	Coeficiente de Variação (%)	1,45	0,56
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade entre operadores	n	36	36
	Média Cq	33,00	29,66
	Coeficiente de Variação (%)	1,4	0,53
	% Réplicas detetadas	100	100
Reprodutibilidade entre equipamentos	n	60	60
	Média Cq	32,47	29,04
	Coeficiente de Variação (%)	2,06	1,23
	% Réplicas detetadas	100	100

12. Controlo de Qualidade

Todos os componentes do kit Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD, da NZYTech foram testados seguindo os protocolos descritos anteriormente. O sistema duplex de qPCR permite detetar as sequências alvo descritas para a identificação do ADN de *C. albicans* e de ADN humano (gene da β-actina, ACTB). Amplificações positivas foram observadas para o gene alvo, controlo positivo e controlo interno através dos canais FAM e HEX.

13. Apoio Técnico

Para apoio técnico, por favor contactar por telefone a nossa equipa dedicada de apoio técnico: +351 213643514 ou através do correio eletrónico: info@nzytech.com.

14. Marcas registadas e direitos de propriedade

Todas as marcas registadas que surgem neste manual são propriedade dos seus respetivos representantes.

15. Tabela de símbolos

IVD	Dispositivo de diagnóstico médico *in vitro*		Consultar instruções para utilização
REF	Número de catálogo		Fabricante
LOT	Código do lote		Usado por
	Limite de temperatura	Σ	Suficiente para
CONTROL +	Controlo positivo		Manter fora do alcance da luz solar (primer/probe mix)
CONTROL –	Controlo negativo		

16. Declaração de Conformidade

Nome do produto: Candida albicans Real-time PCR Kit, IVD

Número de catálogo: MD04891

Utilização: Deteção qualitativa de *Candida albicans*

Fabricante: NZYTech - Genes & Enzymes,
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar
Edifício E, R/C,
1649-038, Lisboa
Portugal

Nós, NZYTech, Lda – Genes & Enzymes, declaramos que este produto, a que esta declaração de conformidade diz respeito, está em conformidade com a norma padrão ISO 9001:2015, seguindo as disposições da diretiva 98/79/EC e do regulamento (EU) 2017/746 aplicado aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, transposta para as leis nacionais dos Estados Membros da União Europeia.

A ficha técnica do produto é mantida na NZYTech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.

Joana Brás, PhD

Diretora Técnica

17. Referências

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/. Access date: 13/01/2022.

Kozel, T. R., & Wickes, B. (2014). Fungal diagnostics. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 4(4), a019299.

nzytech
genes & enzymes

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