



Med·Bio·Agro
LABORATORIES

RevoDx Набір для виявлення ДНК *Candida auris* МЕТОДОМ ПЛР

RevoDx *Candida auris* qPCR Kit

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК *Candida auris*

**Для діагностики *in vitro*
Для професійного використання**



**Каталожні номери:
IP202307-100 – 100 тестів
IP202307-500 – 500 тестів**

Компоненти набору

	Компонент	100 тестів	500 тестів
1	C.auris RM 1	1400 мкл	5 x 1400 мкл
2	C.auris RM 2	100 мкл	500 мкл
3	Позитивний контроль (C.auris Positive Control)	100 мкл	200 мкл
4	Негативний контроль (C.auris Negative Control)	100 мкл	200 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Всі компоненти набору RevoDx Candida auris qPCR Kit слід зберігати при температурі від -25°C до -15°C. Слід уникати зберігання при більш високих температурах. За умов належного зберігання всі компоненти набору залишаються стабільними до закінчення терміну придатності, вказаного на етикетці продукту. Реагенти C.auris RM 1 та C.auris RM 2 не можна заморожувати-розморожувати більше 3 разів, це може призвести до зниження чутливості набору. При необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розділіть набір на кілька аліквот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx Candida auris qPCR Kit — це ПЛР-тест у реальному часі, призначений для якісного виявлення ДНК *Candida auris*.

Негативні результати не виключають наявності інфекції і не повинні використовуватися як єдина підстава для прийняття рішень щодо лікування пацієнта. Негативні результати варто комбінувати з клінічною картиною, історією пацієнта, та епідеміологічною інформацією.

Набір RevoDx Candida auris qPCR Kit призначений для професійного використання кваліфікованим лабораторним персоналом, що пройшов навчання методам ПЛР у реальному часі та процедурам для діагностики in vitro.

Обмеження щодо використання продукту

- Використовувати лише за призначенням
- Набір RevoDx Candida auris qPCR Kit призначений для діагностики in vitro.
- Потенційні мутації в цільових областях геному патогена, залучених у реакції, можуть призвести до хибнонегативних результатів тесту.
- Інгібітори ПЛР в елюатах можуть призвести до хибнонегативних або невалідних результатів тесту.
- Для отримання достовірних результатів необхідно дотримуватись правильних методів збору, транспортування, зберігання та обробки зразків.
- Набір призначений для професійного використання кваліфікованим персоналом, що пройшов відповідне навчання.
- Дотримуйтеся інструкцій з використання до наборів для отримання оптимальних результатів ПЛР.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності. Компоненти набору з різних серій не можна змішувати.

Опис продукту

RevoDx Candida auris qPCR Kit — це набір для виявлення ДНК *Candida auris* методом ПЛР у реальному часі. Під час реплікації ДНК у ході ПЛР, мічений флуоресцентним барвником зонд гібридується з ДНК-матрицею і руйнується 5'-3' ендонуклеазною активністю ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) в міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація ДНК, при чому відбувається розділення молекули флуоресцентного барвника та молекули гасника. Утворені продукти ПЛР можна виявити протягом кількох хвилин завдяки підвищенню рівня флуоресценції, яке відбувається експоненціально з кожним наступним циклом ампліфікації у ході ПЛР. Параметр Ct (пороговий цикл) — це номер циклу ампліфікації, при якому флуоресценція реакційної суміші перевищує фіксоване порогове значення. Для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації в наборі використовується внутрішній контрольний зразок.

Загальний опис

Candida auris - це емерджентний грибовий патоген, який становить значну загрозу через стійкість до багатьох протигрибкових препаратів і здатність легко розповсюджуватись в медичних установах.

Розвиток методів молекулярної діагностики, наприклад розроблені тест-системи ПЛР, є важливим фактором у сфері охорони здоров'я, який дозволяє ефективний контроль грибкових інфекцій завдяки точній та швидкій діагностиці.

Інформація щодо безпеки

- Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; з ними слід працювати в зоні біобезпеки 1-го або 2-го рівня, залежно від збудника інфекції.
- Усі отримані відходи слід вважати потенційно інфекційними. З ними слід поводитись та утилізувати відповідно до місцевих правил безпеки.
- Уникайте будь-якого контакту шкіри з реагентами набору. У випадку контакту ретельно промити водою.
- Уникайте розбризкування та утворення аерозолів.
- Після роботи із клінічними зразками та реагентами необхідно мити руки.
- Інформацію стосовно хімічного складу та безпечності реагентів тощо (MSDS information) можна отримати від виробника чи його представника за запитом.
- При роботі в лабораторії використовувати 3ІЗ.
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражуючими розчинами.
- Переконайтесь, що усі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.

- Поводьтеся з усіма матеріалами відповідно до правил роботи в лабораторіях, що проводять дослідження молекулярно-генетичними методами, щоб запобігти перехресній контамінації.
- Використовуйте тільки повірені/калібровані дозатори та наконечники з аерозольним фільтром.
- Зберігайте набір подалі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктами ампліфікації.
- Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція ДНК/РНК, приготування реакційних сумішей, ампліфікація).
- Усе обладнання та витратні матеріали для конкретної операції повинні знаходитися в зоні, де виконується ця операція, і не повинні переміщатися між різними зонами. Рукавички слід змінювати при переході у кожен зону. Лабораторні халати повинні бути окремими для кожної зони і їх не можна носити за межами цієї зони.
- Роботи повинні виконуватись в одному напрямку, починаючи із зони екстракції ДНК/РНК і закінчуючи відповідними зонами використання.

Характеристики набору

Ліміт детекції (LoD)

Для визначення межі виявлення (LoD) була підготовлена серія розведень патогену до отримання кінцевих концентрацій 2430, 810, 270, 90 та 30 КУО/мл шляхом розведення зразками негативних до патогену осіб для імітації клінічних зразків. ДНК патогена очищали за допомогою RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено в 24 повторях. Значення межі виявлення (LoD) було розраховано за допомогою пробіт-аналізу і становило 81 КУО/мл. Цей ліміт детекції був додатково підтверджений тестуванням 20 зразків, яке показало аналогічні результати.

Діагностична специфічність

Для визначення діагностичної специфічності RevoDx Giardia Lamblia qPCR Kit було протестовано 105 клінічних зразків від окремих донорів, що дали негативний результат при тестуванні на наявність ДНК патогену. Жоден із перевірених зразків не дав позитивного результату тесту. Діагностична специфічність RevoDx Giardia Lamblia qPCR Kit становить $\geq 99\%$

Інклюзивність

Для послідовностей кожного генотипу, доступних у базах даних NCBI, було проведено інклюзивний аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Candida auris qPCR Kit. Результати показали, що ділянки, які розпізнаються розробленими праймерами та зондами, мають 100% гомологію з усіма доступними послідовностями генотипів з баз даних/банків даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

Перехресна реактивність:

Перехресна реактивність набору RevoDx Candida auris qPCR Kit була оцінена за допомогою аналізу *in silico* та за допомогою тестування методом ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Candida auris qPCR Kit проти послідовностей 26 патогенів показав, що набір є специфічним до мішеней і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. Перераховані нижче 25 збудників були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою набору RevoDx Listeria monocytogenes qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не виявлено. Нижче наведені результати дослідження перехресної реактивності, як *in silico*, так і методом ПЛР.

Аналіз перехресної реактивності *in silico*

Організм	Результат
<i>Bacillus subtilis</i>	Немає гомології
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Haemophilus influenzae</i>	Немає гомології
<i>Legionella pneumophila</i>	Немає гомології
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus salivarius</i>	Немає гомології
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Немає гомології
<i>Bordetella pertussis</i>	Немає гомології
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Немає гомології
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Немає гомології
<i>Enterococcus dispar</i>	Немає гомології
<i>Neisseria meningitidis</i>	Немає гомології
<i>Proteus spp.</i>	Немає гомології
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Немає гомології
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Немає гомології
<i>Aspergillus niger</i>	Немає гомології
<i>Salmonella spp.</i>	Немає гомології
<i>Serratia marcescens</i>	Немає гомології
<i>Bacillus subtilis</i>	Немає гомології
Вірус паратрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу А та В	Немає гомології
Ентеровірус (напр. EV68)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Риновірус	Немає гомології
Аденовірус (напр. C1 Ad. 71)	Немає гомології
Метапневмовірус людини (hMPV)	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Концентрація	Результат
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Haemophilus influenzae</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено

<i>Legionella pneumophila</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Bordetella pertussis</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Enterococcus dispar</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Neisseria meningitidis</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Aspergillus niger</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Клінічний зразок	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Коронавірус людини (229E)	NIBSC (Кат.№: 09/132)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Риновірус	NIBSC (Кат.№: 08/324)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Аденовірус	NIBSC (Кат.№: 16/324)	2.0×10 ⁶ МО/мл	Не виявлено
Вірус грипу (A/Christchurch /1/2003, H1N1)	NIBSC (Кат.№: 07/296)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Кат.№: 07/298)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Кат.№: 07/300)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус імунодефіциту людини 1 типу (BIL-1, HIV-1)	NIBSC (Кат.№: 16/194)	1.25×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Вірус імунодефіциту людини 2 типу (BIL-2, HIV-2)	NIBSC (Кат.№: 16/296)	2.8×10 ⁵ МО/мл	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус A2	NIBSC (Кат.№: 08/120)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу 1 типу	NIBSC (Кат.№: 08/176)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу 2 типу	NIBSC (Кат.№: 08/178)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу 3 типу	NIBSC (Кат.№: 08/118)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено
Вірус парагрипу 4 типу	NIBSC (Кат.№: 08/180)	не призначена одиниця виміру	Не виявлено

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для виділення RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP202302 ; idil biotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Cat. No: IP20230 3 ; idil biotech, Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні засоби індивідуального захисту
- Мікропіпетки (0.5 мкл – 1000 мкл)
- Наконечники для дозаторів з аерозольним фільтром та маркуванням DNase/RNase-free
- Мікропробірки 1,5 мл з маркуванням DNase/RNase-free
- Вихровий змішувач (вортекс)
- Настільна мікроцентрифуга для ПЛР-планшетів/стрип-пробірок
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл
- Пробірки або планшети для ПЛР у реальному часі
- Бокс біологічного захисту

Підготовка зразків

Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; під час забору та обробки необхідно дотримуватись запобіжних заходів безпеки.

Клініцисти (а також фельдшери, медсестри, лікарі та спеціалісти, пов'язані із медициною) несуть відповідальність за правильність процедури під час збору та безпечного транспортування зразків до лабораторії. Достовірність результатів тестування значною мірою залежить від належної практики на преаналітичному етапі, що також передбачає точне і повне документування.

Після забору не зберігайте цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Транспортування цільної крові має відповідати державним або місцевим нормам.

Протокол

Виділення ДНК Для виділення ДНК збудників з клінічних зразків слід використовувати RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Використання інших реагентів може негативно вплинути на характеристики набору. Будь ласка, дотримуйтесь інструкцій виробника обраного набору для виділення ДНК/РНК. В ідеалі операції повинні проводитися в трьох окремих зонах (для виділення ДНК/РНК, приготування реагентів для ПЛР, ампліфікації), щоб запобігти контамінації.

Внутрішній контроль Внутрішній контроль (ВК), мішенню якого є РНКаз Р людини, потрібен для підтвердження потрапляння виділеної ДНК у реакційні пробірки. Внутрішній контроль використовується для моніторингу ефективності етапу екстракції ДНК, а також для перевірки будь-якого інгібування ПЛР.

Позитивний контроль Значення Ct позитивного контролю має дорівнювати 26 ± 4, інші значення вказують на наявність проблем.

Протокол ПЛР

1. Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі, крім C.auris RM 2. Покладіть компонент C.auris RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть краплі короточасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджуючий блок.
2. Кінцевий об'єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об'ємів C.auris RM 1 та C.auris RM 2. При цьому враховуються досліджувані клінічні зразки та контрольні зразки. Для уникнення похибок при розкапуванні рекомендується враховувати додатковий зразок при підрахунку загальної кількості зразків.

3. Для приготування майстер-суміші додайте 14 мкл C.auris RM 1 та 1 мкл C.auris RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксів обережно перемішати суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короточасним центрифугуванням. Внести по 15 мкл приготованої суміші у пробірки/планшет для ПЛР. Після внесення майстер-міксу у лунки додайте по 5 мкл екстрагованої ДНК, позитивного контролю та негативного контролю. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.
4. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно протоколу, наведеного у таблиці 3. Вказати об'єм зразка 20 мкл.

Таблиця 3: Програма ампліфікації

Назва етапу	Кількість циклів	Програма
Активация полімерази ("гарячий" старт)	1	95°C, 2 хв
Ампліфікація*	40	95°C, 10 сек
		60°C, 20 сек

* Детекція флуоресценції при 60°C за каналами FAM та HEX

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами FAM та HEX.
6. Запустити програму.

Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Значення Ct позитивного контролю по каналу FAM має дорівнювати 26±4, а негативний контроль у всіх каналах має бути негативним. В іншому випадку експеримент слід повторити.

Результати слід інтерпретувати наступним чином:

Сигнал по каналу FAM (<i>Candida auris</i>)	Сигнал по каналу HEX (внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	ДНК <i>Candida auris</i> виявлена.
-	+	ДНК <i>Candida auris</i> НЕ виявлена.
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат. No.
RevoDx <i>Candida auris</i> qPCR Kit	100 тестів	IP202307-100
RevoDx <i>Candida auris</i> qPCR Kit	500 тестів	IP202307-500