

RevoDx Набір для виявлення *Candida tropicalis* методом ПЛР

RevoDx *Candida tropicalis* qPCR Kit

Інструкція з використання
Якісне виявлення ДНК *Candida tropicalis*
Для використання у діагностиці *in vitro*
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP202312-100 – 100 тестів
IP202312-500 – 500 тестів



Склад набору

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

Транспортування, зберігання та стабільність

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

Передбачене використання

RevoDx *Candida tropicalis* qPCR Kit - це ПЛР-тест у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення ДНК *Candida tropicalis*.

Позитивні результати не виключають коінфекції з іншими патогенами. Виявлений збудник може не бути провідною причиною захворювання. Негативні результати не виключають інфікування і не повинні використовуватися як єдина підстава для прийняття рішень щодо лікування пацієнта. Негативні результати повинні поєднуватися з клінічними спостереженнями, історією хвороби та епідеміологічною інформацією.

Набір RevoDx *Candida tropicalis* qPCR Kit призначений для використання кваліфікованим і підготовленим персоналом клінічної лабораторії, спеціально проінструктованим і навченим методам ПЛР у реальному часі та діагностики *in vitro*.

Обмеження щодо використання продукту

- Набір призначений лише 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 відбору, 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

Candida tropicalis Real-Time PCR assay - це набір для ПЛР-аналізу, що передбачає використання флуорогенного зонду, який гібридується з послідовністю між двома праймерами. Такий зонд містить флуоресцентну мітку на 5'-кінці та молекулу гасника на 3'-кінці, яка пригнічує флуоресцентний репортер.

Під час реплікації ДНК у ході ПЛР, мічений флуоресцентним барвником зонд гібридується з ДНК-матрицею, а потім руйнується через 5'-3' ендонуклеазну активність ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) в міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація ДНК, при цьому 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. У наборі *Candida tropicalis* Real-Time PCR assay використовується внутрішній контроль для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації.

Загальний опис

Candida tropicalis - це вид дріжджів, який може викликати різні інфекції у людини, наприклад інфекції крові (кандидемію), інфекції сечовивідних шляхів, перитоніт і слизово-шкірний кандидоз. Захворювання, спричинені *Candida tropicalis*, часто виникають у людей з ослабленим імунітетом, у тому числі у людей з ВІЛ/СНІДом, онкохворих, які проходять хімотерапію, реципієнтів трансплантатів органів та пацієнтів, які отримують імуносупресивну терапію.

Диференціювати інфекції, спричинені *Candida tropicalis*, від інфекцій, спричинених іншими видами *Candida*, дуже важливо, оскільки підходи до лікування можуть відрізнятися. Точна ідентифікація *Candida tropicalis* допомагає призначати цілеспрямовану протигрибкову терапію. Швидка і точна діагностика зменшує терапевтичні ризики і дозволяє вчасно допомагати пацієнтам з групи високого ризику і таким чином, знижувати захворюваність і смертність інфекцій, викликаних *Candida tropicalis*.

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.
- В лабораторній зоні не можна вживати їжу, напої та палити.
- Необхідно мити руки після контакту зі зразками та реагентами.
- Інформацію стосовно хімічного складу та безпечності реагентів тощо (MSDS information) можна отримати від виробника чи його представника за запитом.
- При роботі у лабораторії необхідно користуватись засобами індивідуального захисту.
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що усі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
- Поводьтесь з усіма матеріалами відповідно до правил роботи в лабораторіях, що проводять дослідження молекулярно-генетичними методами, щоб запобігти перехресній контамінації.
- Використовуйте тільки калібровані дозатори та завжди змінюйте наконечники під час роботи з різними рідинами (бажано використовувати наконечники з аерозольним фільтром).
- Зберігайте набір якомога далі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктів ампліфікації.
- Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція нуклеїнових кислот, приготування реакційних сумішей, ампліфікація) для уникнення контамінації.
- 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 кожну 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

Аналітична чутливість (LoD)

Для визначення ліміту детекції (LoD) була підготовлена серія розведень патогену для отримання кінцевих концентрацій 2430, 810, 270, 90 та 30 КУО/мл, шляхом розведення зразків цільної крові, зібраних у негативних на патоген осіб, для імітації клінічних зразків. ДНК очищали за допомогою набору RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit. Кожне розведення було перевірено у 24 повторях. Ліміт детекції був розрахований за допомогою пробіт-аналізу і становив 86 КУО/мл. Ця межа виявлення була додатково перевірена тестуванням 20 зразків і також становила 86 КУО/мл.

Інклюзивність

Аналіз інклюзивності *in silico* праймерів та зондів набору RevoDx Candida tropicalis qPCR Kit було проведено для послідовностей кожного доступного генотипу у базах даних NCBI. Результати показують, що нуклеотидні ділянки, які розпізнаються розробленими праймерами та зондами, мають 100% гомологію з всіма доступними послідовностями генотипів з Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI).

Перехресна реактивність

Перехресна реактивність набору RevoDx Candida tropicalis qPCR Kit була перевірена *in silico* та шляхом постановки ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Candida tropicalis qPCR Kit проти послідовностей 26 патогенів показав, що набір буде специфічним до цільових генів і не буде перехресно реагувати з цими патогенами. 25 патогенних мікроорганізмів, перерахованих нижче, були протестовані на перехресну реактивність методом ПЛР за допомогою RevoDx Candida

tropicalis qPCR Kit. Хибнопозитивних результатів не спостерігалось.

Нижче наведені результати перехресної реактивності, як у *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>Listeria monocytogenes</i>	Немає гомології
<i>Neisseria meningitidis</i>	Немає гомології
<i>Proteus tropicalis</i>	Немає гомології
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Немає гомології
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Немає гомології
<i>Aspergillus niger</i>	Немає гомології
<i>Salmonella tropicalis</i>	Немає гомології
<i>Serratia marcescens</i>	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу A/B	Немає гомології
Ентеровірус (напр. EV68)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Ріновірус	Немає гомології
Аденовірус (напр. C1 Ad. 71)	Немає гомології
Метапневмовірус людини (Human Metapneumovirus, hMPV)	Немає гомології

Аналіз перехресної реактивності методом ПЛР

Організм	Джерело	Концентрація	Результат
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
<i>Haemophilus influenzae</i>	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
<i>Legionella pneumophila</i>	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
<i>Bordetella pertussis</i>	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
<i>Neisseria meningitidis</i>	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
<i>Aspergillus niger</i>	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
Коронавірус людини (229E)	NIBSC (Cat. No: 09/132)	Не заявлено	Не виявлено
Ріновірус	NIBSC (Cat. No: 08/324)	Не заявлено	Не виявлено
Аденовірус людини	NIBSC (Cat. No: 16/324)	2.0×10 ⁸ IU/ml	Не виявлено
Вірус грипу (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Cat. No: 07/296)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус грипу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat. No: 07/298)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус грипу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat. No: 07/300)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 1 (HIV-1)	NIBSC (Cat. No: 16/194)	1.25×10 ⁵ IU/ml	Не виявлено
Вірус імунodefіциту людини 2 (HIV-2)	NIBSC (Cat. No: 16/296)	2.8×10 ⁵ IU/ml	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус людини A2	NIBSC (Cat. No: 08/120)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус парагрипу тип 1	NIBSC (Cat. No: 08/176)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус парагрипу тип 2	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус парагрипу тип 3	NIBSC (Cat. No: 08/178)	Не заявлено	Не виявлено

	08/118)		
Вірус парагрипу тип 4	NIBSC (Cat. No: 08/180)	Не заявлено	Не виявлено

Додаткові матеріали та обладнання

- Набір для екстракції нуклеїнових кислот RevoDx Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат. No: IP202302; idil biotech, Туреччина) або RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit (Кат. No: IP202303; idil biotech, Туреччина)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні ЗІЗ (халат, рукавички, окуляри)
- 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
- Бокс біологічного захисту
- Пробірки або планшети для ПЛР у реальному часі

Підготовка зразків

Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; і дотримуватись запобіжних заходів під час забору зразків і обробки.

Клініцисти (включаючи фельдшерів, медсестер, лікарів та спеціалістів, пов'язаних із медициною) несуть відповідальність за використання правильної процедури під час забору та безпечного транспортування зразків до лабораторії. Достовірність результатів тестування значною мірою залежить від належної практики на преаналітичному етапі. Також важливим є точне та повне документування.

Після відбору зразки можна зберігати за кімнатної температури не більше 4 годин. Транспортування зразків має здійснюватись відповідно до місцевого законодавства.

Протокол

Екстракція ДНК Для екстракції ДНК з клінічних зразків бажано 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, 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.tropicalis RM 2. Покладіть C.tropicalis RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім обсадить краплі короточасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджувальний блок.
2. Кінцевий об'єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об'ємів C.tropicalis RM 1 та C.tropicalis 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.tropicalis RM 1 та 1 мкл C.tropicalis RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксу 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 РНК, позитивного контрольного зразка та негативного контрольного зразка у відповідні пробірки. Закрити кришки чи заклеїти планшет та осадити краплі центрифугуванням.
4. Запрограмуйте прилад для ампліфікації згідно з протоколом: 95°C 2 хв, 1 цикл; 95°C 10 сек, 60°C 20 сек, 40 циклів (Таблиця 3). Вказати об'єм зразка 20 мкл.

Таблиця 3: Програма ампліфікації

Назва етапу	Кількість циклів	Програма
Активізація 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 HEX та Cy5

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами HEX та Cy5.
6. Запустити програму.
7. Програмування приладу та аналіз результатів здійснювати відповідно до інструкції виробника.

Аналіз даних

Значення Ct позитивного контролю по каналу HEX 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 HEX (Candida tropicalis)	Сигнал по каналу Cy5 (внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	ДНК Candida tropicalis виявлена.
-	+	ДНК Candida tropicalis НЕ виявлена. Результат валідний.
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат. No.
RevoDx Candida tropicalis qPCR Kit	100 тестів	IP202312-100
RevoDx Candida tropicalis qPCR Kit	500 тестів	IP202312-500