



Виробник / Manufacturer:
IDIL BIOTEK ARAŞTIRMA SAN. VE TİC. LTD. ŞTİ.
IDIL BIOTECH ARAŞTIRMA SAN. VE TİC. LTD. ŞTİ.
e-mail: info@idilbiotech.com
www.idilbiotech.com



Уповноважений представник виробника в Україні /
Authorized Representative of the Manufacturer in Ukraine
ТОВ «ВІТАЛПРАЙМ», код за ЄДРПОУ: 458029
LIMITED LIABILITY COMPANY "VITALPRIME"
Тел.: +38 (068) 444-26-94
E-mail: vitalprime@ukr.net

RevoDx Набір реагентів *Cryptococcus neoformans/gattii* (ПЛР)

Інструкція з використання

Якісне виявлення ДНК *Cryptococcus neoformans/gattii*
Для діагностики *in vitro*
Для професійного використання



Каталожні номери:
IP202257-100 – 100 тестів
IP202257-500 – 500 тестів

Склад набору

	Компонент	100 тестів	500 тестів
1	CNG RM 1	1400 мкл	5 x 1400 мкл
2	CNG RM 2	100 мкл	500 мкл
3	Позитивний контроль (CNG Positive Control)	100 мкл	200 мкл
4	Негативний контроль (CNG 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 *Cryptococcus neoformans/gattii* 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. Реагенти CNG RM 1 та CNG RM 2 не можна заморожувати-розморозувати більше 3 разів, це може призвести до зниження чутливості. При необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморозування, розділіть реагенти на кілька аликвот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Передбачене використання

RevoDx *Cryptococcus neoformans/gattii* qPCR Kit - це ПЛР-тест у режимі реального часу, призначений для якісного виявлення ДНК *Cryptococcus neoformans/gattii*.

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 *Cryptococcus neoformans/gattii* 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 патогенів, 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

Cryptococcus neoformans/gattii 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 *Cryptococcus neoformans/gattii* Real-Time PCR assay використовується внутрішній контроль для перевірки якості екстракції нуклеїнових кислот та проходження ампліфікації.

Загальний опис

Криптококоз - це інфекційне захворювання, яке поширене в усьому світі і викликається дріжджами, які належать до відділу *Basidiomycota*. *Cryptococcus neoformans* і *Cryptococcus gattii* є двома етіологічними агентами криптококозу. Криптококоз зазвичай вражає легені або центральну нервову систему (головний і спинний мозок), але може вражати й інші частини тіла. Інфекції головного мозку, спричинені *C. gattii* та іншими видами криптококів, називають криптококовим менінгітом. *C. gattii* розповсюджені в ґрунті та на деяких деревах, переважно в тропічних і субтропічних регіонах по всьому світу. Зараження людини *C. gattii* відбувається під час потрапляння мікроскопічних грибів у дихальну систему. У період від кількох днів до кількох тижнів після зараження можуть розвинути такі симптоми: лихоманка, головний біль, ригідність шиї, нудота і блювота, чутливість до світла, зміна психічного стану, наприклад, сплутаність свідомості, а без лікування можуть розвинути більш серйозні симптоми, які включають пошкодження мозку, кому, втрату слуху, гідроцефалію (водянка головного мозку).

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 розбризування 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 кожену 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 (Limit of Detection, 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 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 повторах. 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 Cryptococcus neoformans/gattii 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 Cryptococcus neoformans/gattii qPCR Kit була перевірена *in silico* та шляхом постановки ПЛР. Аналіз *in silico* праймерів і зондів RevoDx Cryptococcus neoformans/gattii 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 Cryptococcus neoformans/gattii 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 (PJP)</i>	Немає гомології
<i>Enterococcus dispar</i>	Немає гомології
<i>Listeria monocytogenes</i>	Немає гомології
<i>Neisseria meningitidis</i>	Немає гомології
<i>Proteus albicans</i>	Немає гомології
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Немає гомології
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Немає гомології
<i>Aspergillus niger</i>	Немає гомології
<i>Salmonella albicans</i>	Немає гомології
<i>Serratia marcescens</i>	Немає гомології
Вірус парагрипу 1-4 типів	Немає гомології
Вірус грипу А/В	Немає гомології
Ентеровірус (напр. EV68)	Немає гомології
Респіраторно-синцитіальний вірус	Немає гомології
Ріновірус	Немає гомології
Аденовірус (напр. С1 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>Mycoplasma pneumoniae</i>	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
<i>Pneumocystis jirovecii (PJP)</i>	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
<i>Enterococcus dispar</i>	Клінічний зразок	Не заявлено	Не виявлено
<i>Listeria monocytogenes</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 епу (A/Christchurch/1/2003, H1N1)	NIBSC (Cat. No: 07/296)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус епу (A/Wyoming/3/2003, H3N2)	NIBSC (Cat. No: 07/298)	Не заявлено	Не виявлено
Вірус епу (B/Jiangsu/10/2003)	NIBSC (Cat. No: 07/300)	Не заявлено	Не виявлено

Вірус імунодефіциту людини 1 (HIV-1)	NIBSC (Cat. No: 16/194)	1.25×10 ⁵ IU/ml	Не виявлено
Вірус імунодефіциту людини 2 (HIV-2)	NIBSC (Cat. No: 16/296)	2.8×10 ⁵ IU/ml	Не виявлено
Респіраторно-синцитіальний вірус людини А2	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: 08/118)	Не заявлено	Не виявлено
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); B-Prep / U-prep (Replicon, Польща)
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні ЗІЗ (халат, рукавички, окуляри і тп)
- 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
- 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 нуклеїнових кислот. В ідеалі операції повинні проводитись в трьох окремих зонах (для виділення ДНК/РНК, приготування реагентів для ПЛР, ампліфікації), щоб запобігти контамінації.

Внутрішній контроль Внутрішній контроль, мішенню якого є РНКазу 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 CNG RM 2. Покладіть CNG RM 2 на лід. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім обсадити краплі

короткочасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджувальний блок.

2. Кінцевий об'єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об'ємів CNG RM 1 та CNG 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 CNG RM 1 та 1 мкл CNG RM 2 для кожного зразка у підготовлені пробірки. Після приготування майстер-міксу обережно перемішайте суміш піпетуванням або на вортексі та осадити краплі короткочасним 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 ROX

5. Обрати вимірювання рівня флуоресценції при 60°C за каналами HEX та ROX.
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 ROX (Cryptococcus neoformans/gattii)	Сигнал по каналу HEX (внутрішній контроль)	Інтерпретація
+	+/-	ДНК <i>Cryptococcus neoformans/gattii</i> виявлена
-	+	ДНК <i>Cryptococcus neoformans/gattii</i> НЕ виявлена. Результат валідний
-	-	Невалідний результат. Цей зразок слід перевірити повторно

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат. No.
RevoDx Cryptococcus neoformans/gattii qPCR Kit	100 тестів	IP202257-100
RevoDx Cryptococcus neoformans/gattii qPCR Kit	500 тестів	IP202257-500



Виробник / Manufacturer:
 İDİL BİYOTEK ARAŞTIRMA SAN. VE TİC. LTD. ŞTİ.
 İDİL BİYOTEK ARAŞTIRMA SAN. VE TİC. LTD. ŞTİ.
 e-mail: info@idilbiotech.com
 www.idilbiotech.com



Уповноважений представник виробника в Україні /
 Authorized Representative of the Manufacturer in Ukraine:
 ТОВ «ВІТАЛПРАЙМ», код за ЄДРПОУ: 45802919
 LIMITED LIABILITY COMPANY "VITALPRIME"
 Тел.: +38 (068) 444-26-94
 E-mail: vitalprime@ukr.net