

# راهنمای کیت Bacto-Fungal Respiratory Panel

بهار ۱۴۰۵، ویرایش ۱/۰

جهت تشخیص DNA قارچها و باکتری‌های

*Aspergillus* spp. , *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*,  
*Mycobacterium tuberculosis* complex, *Pneumocystis jirovecii*,  
*Streptococcus pneumoniae*

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat# RespIIIRQ24)

Σ 48 (Cat# RespIIIRQ48)

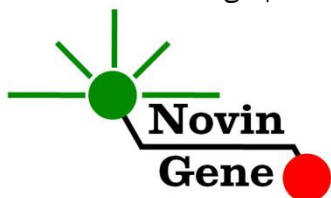
Σ 96 (Cat# RespIIIRQ96)

HB NG-WI-ASL-74-100

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان گیشا، خیابان چهارم، پلاک ۲۰. کد پستی: ۱۴۴۶۸۴۳۴۳۴



## فهرست مندرجات:

۱. مقدمه..... ۳
۲. حیطه کاربرد..... ۳
۳. اطلاعات زمینه ای..... ۳
۴. اساس آزمایش..... ۵
۵. محتویات کیت..... ۶
۶. مدل های بسته بندی..... ۶
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت..... ۷
۸. محدودیت کاربرد..... ۷
۹. سایر موارد مورد نیاز..... ۷
۱۰. احتیاط و اقدامات لازم..... ۸
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۹
۱۲. کنترل داخلی..... ۹
۱۳. استخراج DNA..... ۱۰
۱۴. دستور کار PCR و مراحل آزمایش..... ۱۰
۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها..... ۱۱
۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۱۱
۱۷. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۱۳
۱۸. تحلیل نتایج Rotor-Gene..... ۱۳

۱۹	میزان حساسیت	۲۰
۲۰	روش امحاء	۲۱
۲۱	پشتیبانی فنی	۲۱
۲۲	اطلاعات تماس	۲۱
۲۳	منابع	۲۲
۲۴	توضیحات برچسب	۲۳

## ۱. مقدمه

کیت Bacto-Fungal RQ جهت تشخیص DNA باکتری‌های Mycobacterium tuberculosis complex و Streptococcus pneumoniae، و قارچ‌های Cryptococcus albicans، Aspergillus spp.، Pneumocystis jirovecii و neoformans بوده و طراحی آن به روش PCR Real-time می‌باشد. در این روش، DNA باکتری‌ها و قارچ‌ها به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین این کیت، حاوی سری دیگری از پرایمرها و پروب جهت شناسایی یک توالی سنتتیک به عنوان کنترل داخلی می‌باشد. کنترل داخلی از گزارش منفی کاذب ناشی از استخراج نامناسب و یا مهار PCR جلوگیری می‌کند. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

## ۲. حیطه کاربرد

کیت حاضر با انجام دو واکنش همزمان، امکان بررسی نمونه بیمار، جهت تشخیص DNA باکتری‌های Mycobacterium tuberculosis complex و Streptococcus pneumoniae، و قارچ‌های Candida albicans، Aspergillus spp.، Pneumocystis jirovecii، و Cryptococcus neoformans را به روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene و MIC طراحی شده است.

## ۳. اطلاعات زمینه‌ای

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس Mycobacterium tuberculosis باسیل اسیدفست با رشد آهسته و عامل بیماری سل است. انتقال این باکتری عمدتاً از طریق استنشاق ذرات معلق حاوی عامل بیماری‌زا صورت گرفته و در درجه اول موجب درگیری

ریوی همراه با التهاب و سپس نکروز پنیری (Caseous Necrosis) می‌شود. این پاتوژن قادر است به صورت عفونت نهفته در بدن باقی مانده و به ویژه در شرایط سرکوب سیستم ایمنی مجدداً فعال شود. عامل این بیماری، گروهی از باکتری‌های درون سلولی هستند که مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس (Mycobacterium tuberculosis complex) نامیده می‌شوند. مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (M. Tuberculosis)، مایکوباکتریوم بوویس (M. bovis) و مایکوباکتریوم بوویس ب ت ژ (M. bovis BCG) از جمله این باکتری‌ها هستند.

استرپتوکوکوس پنومونیه *Streptococcus pneumoniae* یک دیپلوکوک گرم مثبت و کپسول دار است که از مهم‌ترین پاتوژن‌های دستگاه تنفسی انسان به شمار می‌رود. این باکتری از طریق قطرات تنفسی منتقل شده و معمولاً در ناحیه بینی-حلقی (Nasopharynx) افراد سالم حضور دارد، اما در شرایط خاص می‌تواند موجب بیماری‌های تهاجمی و غیرتهاجمی شود. این ارگانسیم یکی از شایع‌ترین عوامل پنومونی اکتسابی، مننژیت، اوتیت میانی (otitis media) و باکتری می (Bacteremia)، به ویژه در کودکان، سالمندان و افراد دارای بیماری‌های زمینه‌ای است.

گونه‌های آسپرژیلوس *Aspergillus spp.* قارچ‌های رشته‌ای هستند که به طور گسترده در منابع محیطی نظیر خاک، هوا و مواد آلی در حال تجزیه یافت می‌شوند. این قارچ‌ها از پاتوژن‌های فرصت طلب مهم محسوب شده و با طیف وسیعی از بیماری‌های ریوی، به ویژه در بیماران دارای نقص ایمنی مرتبط هستند.

کاندیدا آلبیکانس *Candida albicans* یک مخمر فرصت طلب است که به عنوان بخشی از فلور طبیعی مخاطی انسان، از جمله دستگاه گوارش و ناحیه دهانی-حلقی (Oropharynx)، شناخته می‌شود. اگرچه حضور این ارگانسیم در نمونه‌های

تنفسی اغلب ناشی از کلونیزاسیون است، اما در بیماران با نقص ایمنی شدید می‌تواند با عفونت‌های مهاجم کاندیدیایی مرتبط باشد.

کریپتوکوکوس نئوفورمانس *Cryptococcus neoformans* یک مخمر کپسول‌دار است که در منابع محیطی، به‌ویژه خاک آلوده به فضولات پرندگان، یافت می‌شود. این قارچ از عوامل فرصت‌طلب مهم انسانی بوده و پس از استنشاق ذرات عفونی می‌تواند سبب عفونت کریپتوکوکوزیس ریوی گردد. در افراد دارای نقص ایمنی، به‌ویژه بیماران مبتلا به اختلال ایمنی سلولی، این قارچ می‌تواند منجر به عفونت‌های ریوی شود.

پنوموسیستیس جیرووسی *Pneumocystis jirovecii* یک قارچ فرصت‌طلب است که برخلاف بسیاری از قارچ‌ها فاقد ارگوسترول در غشای سلولی بوده و به عنوان یک پاتوژن خارج سلولی اجباری در آلوئول‌های ریوی شناخته می‌شود. انتقال عامل بیماری عمدتاً از طریق مسیر تنفسی و استنشاق ذرات معلق در هوا صورت می‌گیرد و می‌تواند منجر به بروز پنومونی ناشی از پنوموسیستیس (*Pneumocystis* Pneumonia; PCP) به ویژه در بیماران مبتلا به نقص در سیستم ایمنی، گیرندگان پیوند و سایر افراد تحت درمان‌های سرکوب‌کننده ایمنی شود.

#### ۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی عامل عفونی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR/Polymerase Chain Reaction انجام می‌شود. طی این واکنش بخشی از ژنوم عامل عفونی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود عامل عفونی را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز

به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش‌هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

### ۵. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما و مواد زیر می باشد:

حجم	محتوا	برچسب
۳۶۰ میکرولیتر	میکس PCR* برای تشخیص Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumoniae, Internal Control	Bacto A Mix
۳۶۰ میکرولیتر	میکس PCR* برای تشخیص Aspergillus spp., Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Pneumocystis Jirovecii	Fungal A Mix
۲۵۰ میکرولیتر	شاهد مثبت	Positive Ctrl
۲۵۰ میکرولیتر	کنترل داخلی*	Internal Ctrl
۲۰۰ میکرولیتر	آب مخصوص PCR	Water

\* ۱، ۲، ۴ عدد، به ترتیب برای کیت‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

### ۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست و چهار، چهار و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می باشد.

## ۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰- درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند. از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود. همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

## ۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه ای و آموزش دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج می گردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده نمود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی (IVD) مورد تایید نمی باشد.

## ۹. سایر موارد مورد نیاز

- برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:
- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
  - ورتکس (Vortex Mixer)

- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA و تجهیزات و لوازم مورد نیاز آن
- میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

## ۱۰. احتیاط و نکات لازم

- برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:
- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
  - نمونه‌های تنفسی ممکن است حاوی پاتوژن‌های منتقله از هوا باشند و باید با استفاده از روش‌های مهار مناسب و تجهیزات حفاظت فردی بررسی شوند.
  - در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای انتقال میکس به میکروتیوب های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به میکروتیوب PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود داشته باشند به ویژه سمپلر. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
  - سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
  - پیش از باز کردن درپوش تیوب های کیت، آن ها را کاملا ذوب نموده و با چند تکان ملایم، از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر تیوب اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ‌های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می‌شود.

## ۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه به دست آمده از بخش تحتانی دستگاه تنفسی مانند مایع لاواژ برونکوالوئولار BAL (bronchoalveolar lavage)، و خلط، نمونه های مناسب برای انجام آزمایش با این کیت هستند. نمونه در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد برای چند ساعت قابل نگهداری است و برای زمان های طولانی تر می‌باید نمونه را در دمای ۲۰ درجه زیر صفر یا پایین تر نگهداری نمود در چنین شرایطی نمونه تا چند روز پایدار می‌ماند.

## ۱۲. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می‌باشد.

کنترل داخلی را بایستی در مرحله استخراج استفاده نموده. به این منظور، هنگام استخراج DNA، کنترل داخلی را پس از افزودن بافر lysis به نمونه، اضافه کنید. میزان مورد نیاز از کنترل داخلی ده درصد حجم حلال نهایی (elution buffer) می‌باشد. یعنی در صورتی که DNA را نهایتاً در ۱۰۰ میکرولیتر بافر حل می‌کنید، ۱۰ میکرولیتر از کنترل داخلی را به مخلوط نمونه و بافر Lysis اضافه نمایید.

توجه داشته باشید که کنترل داخلی نباید مستقیماً به نمونه بیمار (یعنی پیش از افزودن بافر lysis) اضافه شود زیرا کارایی خود را از دست خواهد داد.

در صورت موفق بودن PCR کنترل داخلی با میکس Bacto A منجر به تولید

فلورسانس با تابش زرد و CT بین ۲۸ تا ۳۲ می شود.

### ۱۳. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه از روش ها و کیت های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت زیر را توصیه می کنیم:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)

### ۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

این کیت حاوی دو میکس می باشد و هر نمونه همزمان در دو واکنش بررسی می شود. میکس Bacto A برای تشخیص باکتری های Mycobacterium tuberculosis complex و Streptococcus pneumoniae و همچنین بررسی کنترل داخلی می باشد.

میکس دوم Fungal A جهت بررسی نمونه از نظر وجود قارچ های Aspergillus spp., Candida albicans, Cryptococcus neoformans و Pneumocystis jirovecii می باشد.

ابتدا تمامی تیوب های کیت را روی یخ خرد شده قرار دهید تا به طور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آن ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. برای هر میکس یک سری لوله جداگانه قرار دهید. در هر سری علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، یک میکروتیوب برای شاهد مثبت و یک میکروتیوب برای کنترل منفی (آب) نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله سری اول ۱۵ میکرولیتر از **Bacto A Mix** اضافه کنید.

به هر لوله سری دوم ۱۵ میکرولیتر از **Fungal A Mix** اضافه کنید. سپس

۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده، **شاهد مثبت** یا آب به هر لوله اضافه

کنید.

دربوش میکروتیوب ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید. توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

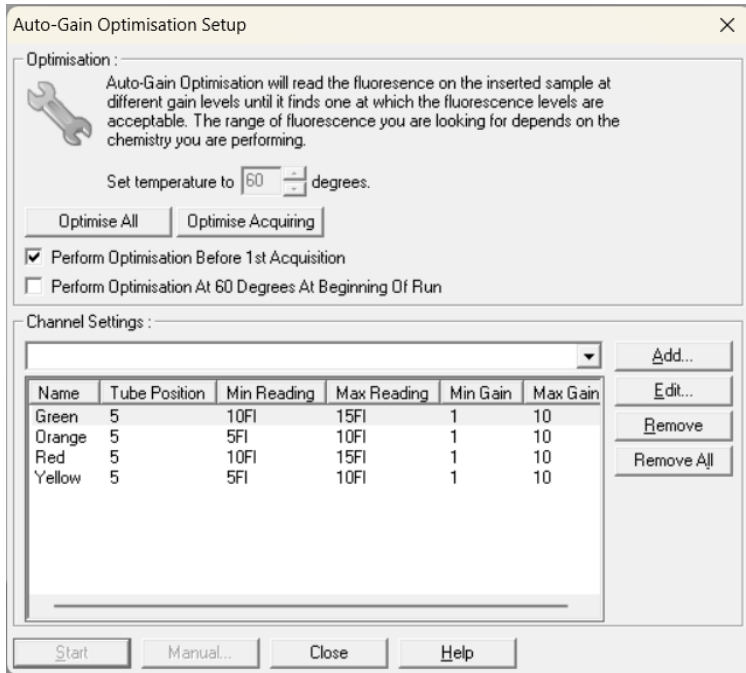
### ۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت Bacto-Fungal RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene و MIC طراحی شده است.

### ۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید! دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر متصل کرده و سپس آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود. در کارت حافظه همراه کیت روی Bacto-Fungal 0.1 و یا Bacto-Fungal 0.2 (با توجه به نوع میکروتیوب های استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود. نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منو نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در Auto-Gain Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید.

تنظیمات را دقیقاً مطابق تصویر زیر برای هر چهار کانال انجام دهید. در نظر داشته باشید برای هر چهار کانال، Tube Position را روی شماره تیوبی تنظیم کنید که حاوی میکس **Fungal A** باشد. گزینه **Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition** را فعال کنید و پنجره را ببندید.



## تنظیمات Gain Optimisation

سپس در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود. در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید.

## ۱۷. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های چهار کاناله Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید.

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 3 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 75 sec*	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM، VIC، ROX و Cy5 تنظیم شود.

توجه داشته باشید که در این آزمایش ROX نباید به عنوان رنگ مرجع (reference dye) انتخاب شود.

\*این زمان در دستگاه Rotor-Gene معادل ۶۰ ثانیه می باشد و برای سایر دستگاه ها معادل ۷۵ ثانیه می باشد.

## ۱۸. تحلیل نتایج Rotor-Gene

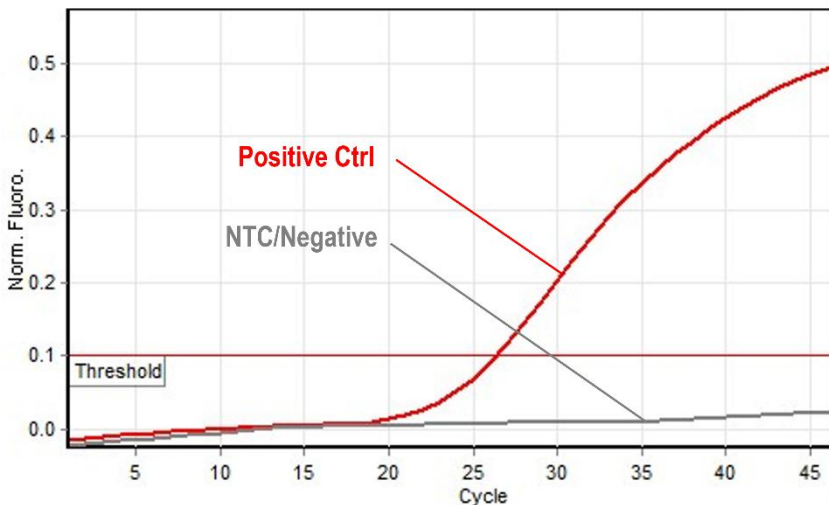
نتایج بر اساس واکنش نمونه ها با دو میکس Bacto A و Fungal A در چهار کانال تفسیر می شود. در جدول زیر به طور خلاصه مشخص شده است که چهار کانال مورد بررسی برای هر یک از میکس ها مربوط به کدام عامل عفونی است.

Mix/Channel	Green/FAM	Yellow/HEX	Orange/ROX	Red/Cy5
Bacto A Mix	Mycobacterium tuberculosis	Internal Ctrl	-	Streptococcus pneumoniae
Fungal A Mix	Cryptococcus neoformans	Pneumocystis Jirovecii	Candida albicans	Aspergillus spp.

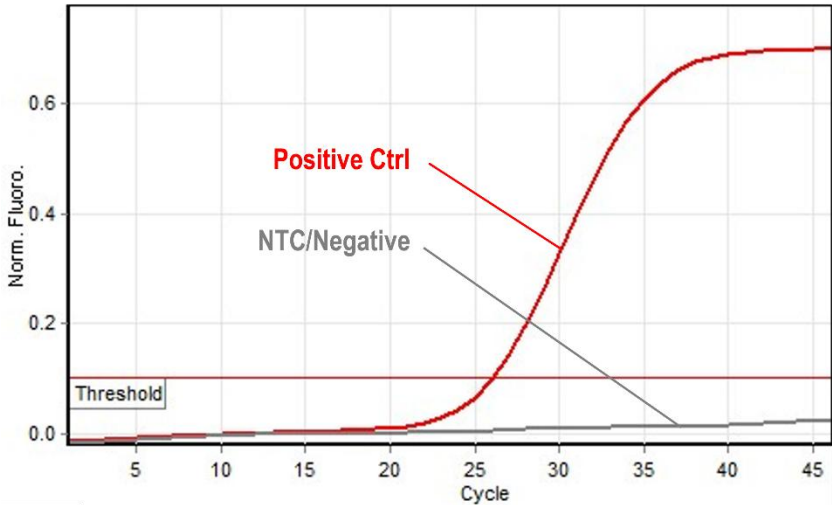
الف) آنالیز نتایج نمونه ها با Bacto A Mix:

به طور خلاصه از منوی **Quantitation, Analysis** را انتخاب کرده و روی **Green** دوبار کلیک کنید. سپس آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. فرایند فوق را برای کانال های **Yellow** و **Red** نیز تکرار کنید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهد های مثبت، منفی و کنترل داخلی تصاویر ۱، ۲ و ۳ را ملاحظه فرمایید. توجه داشته باشید که در میکس **Bacto A** افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **Mycobacterium tuberculosis complex**، افزایش **تابش قرمز (Red)** مربوط به **Streptococcus pneumoniae** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** مربوط به **Internal Control** می باشد.

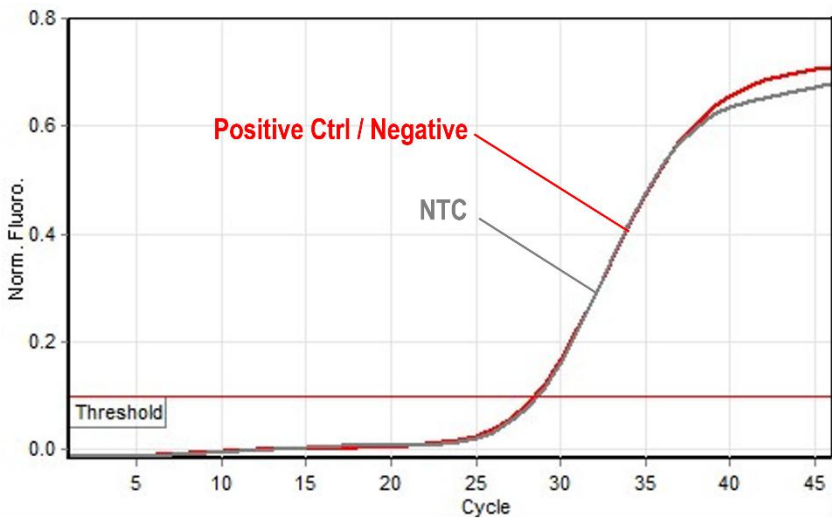
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت **CT** معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب می شود و **CT** آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می باشد.



شکل ۱. منحنی شاهد ها با **Bacto A Mix** در کانال سبز دستگاه روتورژن (**Mycobacterium tuberculosis complex**)



شکل ۲. منحنی شاهدها با Bacto A Mix در کانال قرمز دستگاه روتورژن (*Streptococcus pneumoniae*)



شکل ۳. منحنی شاهدها با Bacto A Mix در کانال زرد دستگاه روتورژن (کنترل داخلی)

نتایج نمونه با **Bacto A Mix** را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** با CT کمتر از ۴۰ مثبت باشد، از نظر *Mycobacterium tuberculosis complex* **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **قرمز** با CT کمتر از ۴۰ مثبت باشد، از نظر *Streptococcus pneumoniae* **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** و **قرمز** منفی و در کانال **زرد** مثبت با CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه از نظر *Mycobacterium tuberculosis complex* و *Streptococcus pneumoniae* **منفی** است.
- در صورتی که نمونه در هر سه کانال **سبز**، **زرد** و **قرمز** منفی باشد بدون توجه به نتیجه در دو کانال **سبز** و **قرمز**، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

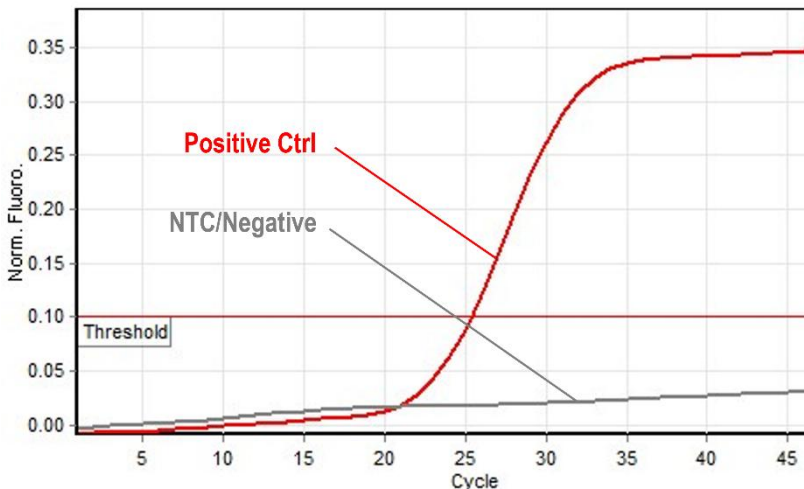
خلاصه تفسیر نتایج با Bacto A Mix در جدول زیر آمده است.

Bacto A Mix			
Green/ FAM	Yellow/ VIC	Red/ Cy5	Result
+	-/+	-	Pos for <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
-	-/+	+	Pos for <i>Streptococcus pneumoniae</i>
-	+	-	Negative
-	-	-	Inconclusive

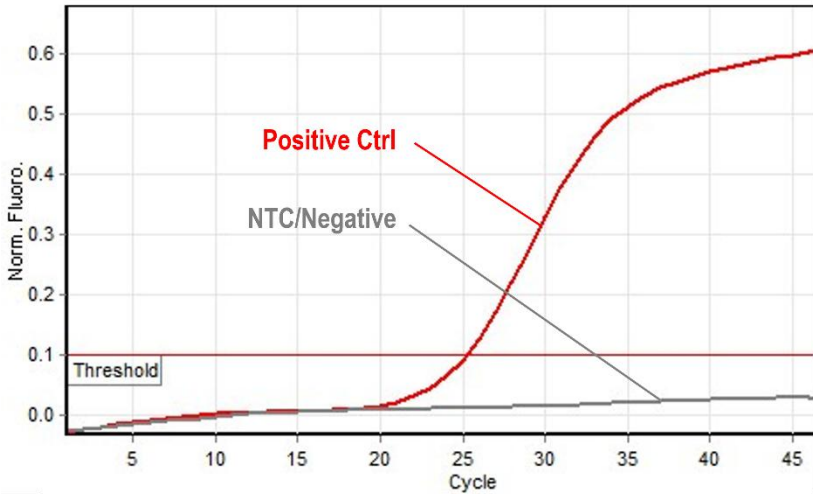
**ب) آنالیز نتایج نمونه ها با Fungal A Mix :**

به طور خلاصه از منوی Quantitation Analysis را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. سپس آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. فرایند فوق را برای کانال Orange، Yellow و Red نیز تکرار کنید و آستانه را روی ۰/۱ تنظیم نمایید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهد‌های مثبت و منفی تصاویر ۴، ۵، ۶ و ۷ را ملاحظه فرمایید.

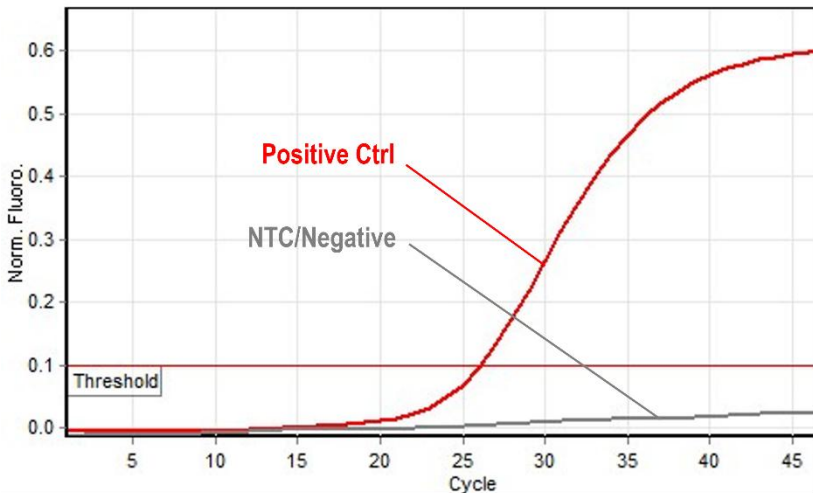
توجه داشته باشید که افزایش تابش سبز (Green) مربوط به **Cryptococcus neoformans**، افزایش تابش زرد (Yellow) مربوط به **Pneumocystis Jirovecii**، افزایش تابش نارنجی (Orange) حاصل از **Candida albicans** و افزایش تابش قرمز (Red) مربوط به **Aspergillus spp.** می‌باشد.



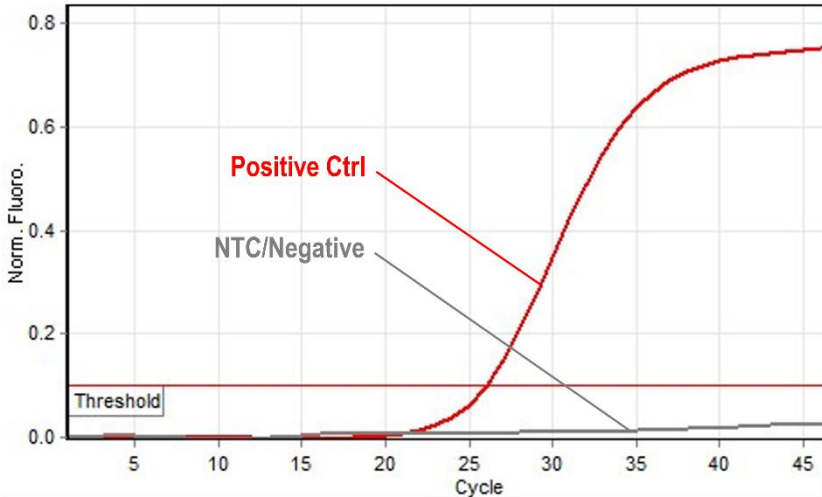
شکل ۴. منحنی شاهد‌ها با Fungal A Mix در کانال سبز دستگاه روتورژن (*Cryptococcus neoformans*)



شکل ۵. منحنی شاهد‌ها با Fungal A Mix در کانال زرد دستگاه روتورژن (*Pneumocystis Jirovecii*)



شکل ۶. منحنی شاهد‌ها با Fungal A Mix در کانال قرمز دستگاه روتورژن (*Aspergillus Spp*)



شکل ۷. منحنی شاهد‌ها با Fungal A Mix در کانال نارنجی دستگاه روتورژن (Candida albicans)

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب می‌شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می‌باشد.

نتایج نمونه با **Fungal A Mix** را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** با CT کمتر از ۴۰ مثبت باشد، از نظر **Cryptococcus neoformans** مثبت است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** با CT کمتر از ۴۰ مثبت باشد، از نظر **Pneumocystis Jirovecii** مثبت است.

- در صورتی که نمونه در کانال **قرمز** با CT کمتر از ۴۰ مثبت باشد، از نظر *Aspergillus spp.* **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **نارنجی** با CT کمتر از ۴۰ مثبت باشد، از نظر *Candida albicans* **مثبت** است.
- در صورتی نمونه با با هر دو میکس در تمامی کانال ها (از جمله برای کنترل داخلی) منفی باشد نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. خلاصه تفسیر نتایج با میکس Fungal A در جدول زیر آمده است.

Fungal A Mix				
Green/ FAM	Yellow/ VIC	Red/ Cy5	Orange/ ROX	Result
+	-	-	-	Positive for <b>Cryptococcus neoformans</b>
-	+	-	-	Positive for <b>Pneumocystis Jirovecii</b>
-	-	+	-	Positive for <b>Aspergillus spp.</b>
-	-	-	+	Positive for <b>Candida albicans</b>
-	-	-	-	Negative if sample IC is <b>Positive</b>
-	-	-	-	Inconclusive (If sample is also Negative in all channels with <b>Bacto A Mix</b> )

### ۱۹. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم

Mycobacterium باکتری ها و قارچ های مورد نظر بررسی شده است و برای tuberculosis complex معادل ۱ کپی در میکرولیتر می باشد، برای Candida Streptococcus pneumoniae معادل ۳۸ کپی در میکرولیتر، برای Cryptococcus neoformans albicans معادل ۲۴ کپی در میکرولیتر، برای Pneumocystis Jirovecii معادل ۲۱ کپی در میکرولیتر، و برای Aspergillus spp. معادل ۸۷ کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتراژ عامل عفونی در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتراژ نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

## ۲۰. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیک یا شیمیایی بوده و می توان آنها را مستقیماً به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

## ۲۱. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

## ۲۲. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان گیشا، خیابان چهارم، پلاک ۲۰. کد پستی: ۱۴۴۶۸۴۳۴۳۴

تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: [info@novingene.com](mailto:info@novingene.com)

وبسایت: [www.novingene.ir](http://www.novingene.ir)

### ۲۳. منابع

- Alspaugh, J.A., 2015. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 78, pp.55-58.
- Bateman, M., Oladele, R. and Kolls, J.K., 2020. Diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a review of current methods and novel approaches. *Medical Mycology*, 58(8), pp.1015-1028.
- Fosses Vuong, M., Hollingshead, C.M. and Waymack, J.R., 2023. *Aspergillosis*.
- Gagneux, S., 2018. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, 16(4), pp.202-213.
- Mackay IM., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 10 (3): 190 – 212.
- Narciso, A.R., Dookie, R., Nannapaneni, P., Normark, S. and Henriques-Normark, B., 2025. *Streptococcus pneumoniae* epidemiology, pathogenesis and control. *Nature Reviews Microbiology*, 23(4), pp.256-271.
- Prasad, R., 2017. *Candida albicans*. Springer International Publishing.

۲۴. توضیحات برجسب

دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید 	تولید کننده 	جهت مصارف پژوهشی <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">RUO</span>
تاریخ انقضاء 	تعداد >n> آزمون کافی 	کدبهر (شماره بچ) <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">LOT</span>
محدوده دمایی  -30°C / 10°C	شماره سریال <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SN</span>	شماره کاتالوگ <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">REF</span>

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی [www.novingene.ir](http://www.novingene.ir) مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.



# Bacto-Fungal Respiratory Panel Kit Manual

Spring 2026, Version 1.0

For Real-Time PCR Detection of *Aspergillus* spp., *Candida albicans*,  
*Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium tuberculosis* complex,  
*Pneumocystis jirovecii*, *Streptococcus pneumoniae* DNA  
For Research Use Only

 24 (Cat# RespIIIIRQ24)

 48 (Cat# RespIIIIRQ48)

 96 (Cat# RespIIIIRQ96)

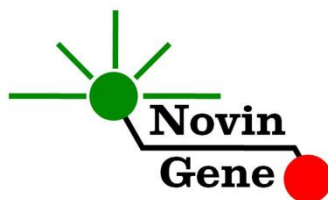
 NG-WI-ASL-74-100

RUO



**NovinGene ParsVira**

No. 20, 4<sup>th</sup> St, Gisha, Tehran, Iran 1446843434.



# Table of Contents

1. Introduction .....	3
2. Intended Use .....	3
3. Background Information .....	3
4. Test Principle .....	5
5. Kit Contents .....	5
6. Packaging models .....	6
7. Storage and Stability .....	6
8. Product Use Limitations .....	6
9. Additionally Required Materials .....	6
10. General Precautions .....	7
11. Specimen, Storage and Transport .....	7
12. Internal Control (IC) .....	7
13. DNA Isolation .....	8
14. PCR Protocol .....	8
15. Devices and software .....	9
16. Programming of the Rotor-Gene .....	9
17. Programming Other Machines .....	10
18. Data Analysis: Rotor-Gene .....	11
19. Sensitivity .....	18
20. Disposal Method .....	18

21. Technical Support.....	19
22. Contact Information.....	19
23. References .....	19
24. Symbols.....	20

## 1. Introduction

Bacto-Fungal RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR test designed for detecting DNA of respiratory pathogens including bacterial pathogens; *Streptococcus pneumoniae* and *Mycobacterium tuberculosis* complex and Fungal pathogens; *Aspergillus* spp., *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Pneumocystis Jirovecii*. All required reagents are included in the PCR Mixes provided in the kit. This kit also contains a different series of primers and probe for detecting a synthetic DNA sequence. The kit supplies this synthetic DNA sequence as an Internal Control (IC). The IC can be used either during DNA extraction or in the PCR reaction to prevent false negative results due to failure in the above steps.

This kit is intended for Research Use Only!

## 2. Intended Use

The Bacto-Fungal RQ Kit is a multiplex real-time PCR assay designed for the simultaneous detection of six clinically significant bacterial and fungal respiratory pathogens in two separate reactions. These pathogens include, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Streptococcus pneumoniae*, *Aspergillus* spp., *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Pneumocystis Jirovecii*. This kit is compatible with Rotor-Gene and MIC machines.

## 3. Background Information

*Mycobacterium tuberculosis* is a slow-growing, acid-fast bacillus and the etiologic agent of tuberculosis. Transmission occurs via airborne droplet nuclei, leading primarily to pulmonary infection characterized by granulomatous inflammation and caseating necrosis. It is capable of latent infection with potential for reactivation, particularly under conditions of immunosuppression.

*Streptococcus pneumoniae* is a Gram-positive, encapsulated diplococcus and a major human respiratory pathogen. It is transmitted via respiratory droplets and commonly colonizes the nasopharynx before causing invasive or non-invasive disease. Clinically, it is a leading cause of community-acquired pneumonia, meningitis, otitis media, and bacteremia, particularly in vulnerable populations such as children and the elderly.

*Aspergillus* species are filamentous, saprophytic fungi widely distributed in environmental sources such as soil, air, and decomposing organic matter. They are clinically significant opportunistic pathogens associated with a spectrum of pulmonary diseases, particularly in immunocompromised patients.

*Candida albicans* is an opportunistic dimorphic yeast that is part of the normal human microbiota of mucosal surfaces including the oropharyngeal and gastrointestinal tracts. Although commonly considered a colonizer in respiratory samples, it may be associated with invasive candidiasis in severely immunocompromised patients or those in intensive care settings. Its clinical relevance in respiratory specimens should be interpreted in conjunction with clinical presentation and risk factors.

*Cryptococcus neoformans* is an encapsulated basidiomycetous yeast found in environmental reservoirs such as soil contaminated with avian excreta. It is a clinically important opportunistic pathogen capable of causing pulmonary cryptococcosis following inhalation of infectious propagules. In immunocompromised individuals, causing cryptococcal meningitis.

*Pneumocystis jirovecii* is an atypical fungal organism lacking ergosterol in its cell membrane and it is classified as an obligate extracellular pathogen of the lung alveoli. *P. jirovecii* is associated with *Pneumocystis pneumonia* (PCP), predominantly in immunocompromised hosts such as HIV-infected patients or individuals receiving immunosuppressive therapy.

#### 4. Test Principle

The pathogens are detected using PCR, where primers specific to the target genome amplify its unique sequence. Real-Time PCR facilitates the detection of the amplified product through fluorescent-labeled probes. Monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

#### 5. Kit Contents

The kit contains a manual and the following reagents:

Label	Content	Quantity
Bacto A Mix	PCR mix* for Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumoniae, Internal Control	360 µl
Fungal A Mix	PCR mix* for Aspergillus pp., Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Pneumocystis Jirovecii	360 µl
Positive Ctrl	Positive Control	250 µl
Internal Ctrl	Internal Control*	250 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

\* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits respectively.

## 6. Packaging models

The kit is available in 24, 48, and 96 reactions of 25 microliters.

## 7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaw more than three times to prevent reduced sensitivity.

## 8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.
- The user manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applications.

## 9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and the and the accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Adjustable pipettors and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit and required equipments/items
- PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves

- Cold block

## 10. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- **Treat all samples as potentially infectious. respiratory samples may contain airborne pathogens and should be processed using appropriate containment procedures and personal protective equipment.**
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the master-mix is aliquoted into tubes, and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the PCR tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- **Place kit components on ice till completely thawed, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.**
- **Keep the PCR Mix tube at -20°C at all times. Take it out just before use and return it to freezer immediately after.**
- Do not place 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cold block instead.

## 11. Specimen, Storage and Transport

Samples should be collected from lower respiratory tract and include bronchoalveolar lavage (BAL) and Sputum. Samples could be stored at 2-8°C for a few hours and at -20°C or lower for longer periods.

## 12. Internal Control (IC)

To assess the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition and to prevent false negative results, this kit contains an

internal control (IC). IC should be used during the extraction process to monitor both DNA extraction and PCR reaction. IC should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample during extraction. The required volume of IC is 10% of the elution buffer. For instance, if the extracted DNA is eluted with 100ul, then 10ul of IC should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample. **Please note that IC should not be added directly to the patient sample (i.e. before the addition of lysis buffer) as it loses its efficiency.**

In a successful DNA extraction and PCR test, IC should generate a CT of 28-32 in Yellow channel with Mix Bacto A.

### 13. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)

### 14. PCR Protocol

This kit includes two mixes, **Bacto A Mix** which detects *Streptococcus pneumoniae* and *Mycobacterium tuberculosis* complex and **Fungal A Mix** which detects *Aspergillus* spp., *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and *Pneumocystis Jirovecii*.

Thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin.

Each sample should be examined in two reactions in parallel. Place two series of tubes on cold block. In each series, consider one tube for each sample plus one for positive control and one for water.

**Aliquot 15ul of Bacto A Mix to the first series of PCR tubes**

**Aliquot 15µl of Fungal A Mix to each tube of the second series followed by adding 10µl of extracted DNA, Positive Control or water.**

Cap the tubes and visually inspect to ensure all are capped securely. Place the tubes in the machine.

*Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.*

## **15. Devices and software**

Bacto-Fungal RQ kit is designed for use with Rotor-Gene and MIC.

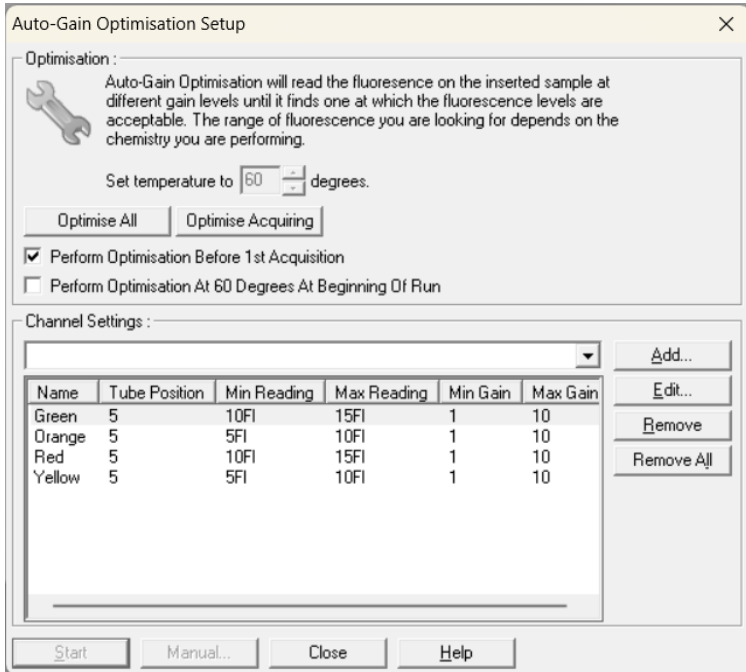
## **16. Programming of the Rotor-Gene**

*Before starting the machine, ensure you have attached the locking ring on the rotor!*

Open the Bacto-Fungal template file for Rotor-Gene (provided in the Flash card, or accessible by Kit QR code) double-click on "Bacto-Fungal 0.1" or " Bacto-Fungal 0.2" depending on the tubes used.

Note: in the View menu, select the Gain Optimisation. Under the Auto-Gain Optimisation Setup, select the Optimise Acquiring option. Adjust the setting according to the following image.

make sure the selected Tube Position contains Fungal A Mix. Enable the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition" and close the window.



Gain Optimisation Setting

Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the program.

## 17. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	<b>95°C x 3 min</b>	1
2	<b>95°C x 15 sec</b>	45
	<b>60°C x 75 sec*</b>	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM, VIC, ROX and Cy5 dyes. *In this experiment, ROX should not be selected as the reference dye.*

\* 60 seconds for Rotor-Gene, 75 seconds for other machines.

## 18. Data Analysis: Rotor-Gene

The results are interpreted based on the reaction of the samples with the two mixes according to the following table.

Mix/Channel	Green/FAM	Yellow/HEX	Orange/ROX	Red/Cy5
Bacto A Mix	Mycobacterium tuberculosis	Internal Ctrl	-	Streptococcus pneumoniae
Fungal A Mix	Cryptococcus neoformans	Pneumocystis Jirovecii	Candida albicans	Aspergillus spp.

### A) Analysis of the sample results with Bacto A Mix:

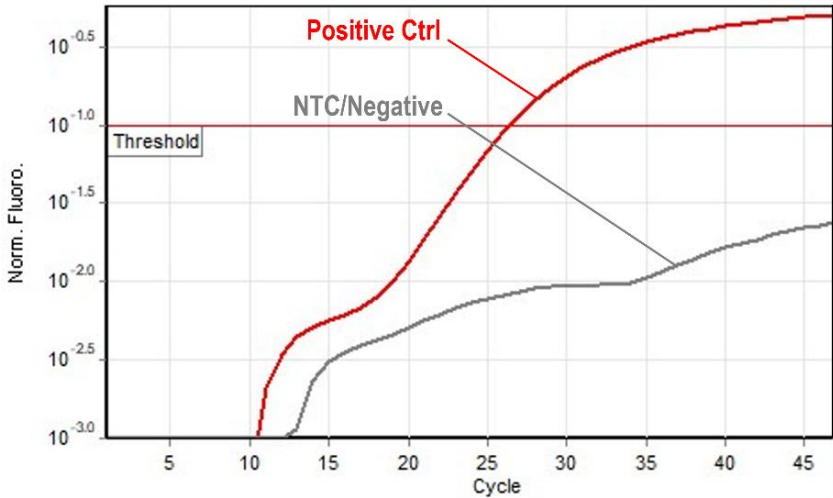
To analyze data of **Bacto A Mix** briefly, click on the analysis menu and then under Quantitation tab double click on cycling A. Green. Manually put threshold, at 0.1. Repeat the above for Red and Yellow Channels.

Figures 1, 2 and 3 represent typical graphs with Bacto A Mix for Rotor-Gene.

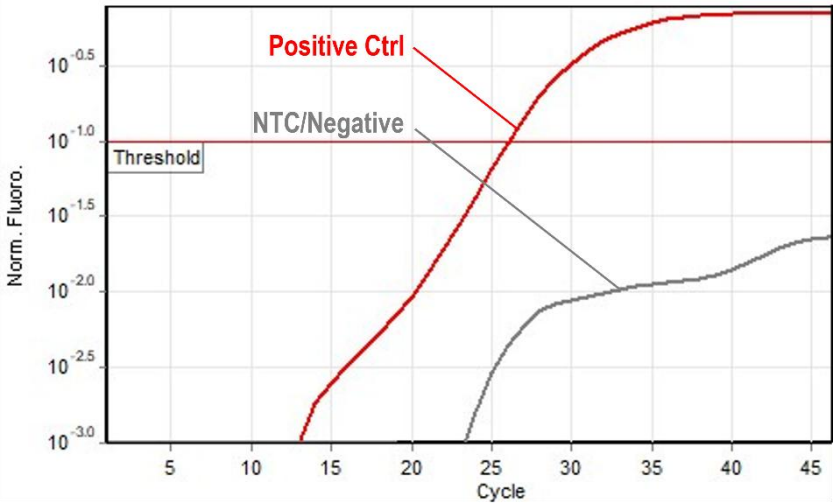
To interpret the results, please note that:

with the **Bacto A Mix**, a signal detected in the **Green** channel indicates **Streptococcus pneumoniae**, a signal in the **Red** channel represents **Streptococcus pneumoniae** and a signal in the **Yellow** channel is due to **Internal Control**.

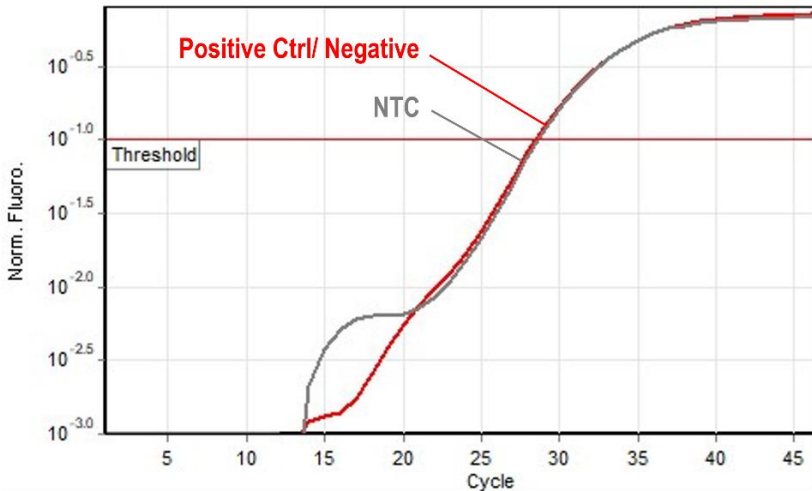
**Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.**



**Fig 1.** Typical Controls graph with Bacto A Mix in Green channel for Rotor-Gene (*Mycobacterium tuberculosis* complex)



**Fig 2.** Typical Controls graph with Bacto A Mix in Red channel for Rotor-Gene (*Streptococcus pneumoniae*)



**Fig 3.** Typical Controls graph with Bacto Mix in Yellow channel for Rotor-Gene (Internal Control)

Consider the following points when analyzing results with [Bacto A Mix](#):

- A sample is **Positive** for Mycobacterium tuberculosis complex if it is positive in the **Green** channel with a sigmoid graph and CT of less than 40.
- A sample is **Positive** for Streptococcus pneumoniae if it is positive in the **Red** channel with a sigmoid graph and CT of less than 40.
- A sample is **Negative** for Mycobacterium tuberculosis complex and Streptococcus pneumoniae if it is negative in the **Green** and the **Red** channels while it is positive in the **Yellow** channel with a sigmoid graph and CT of 28-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in all three channels, **Green**, **Red** and **Yellow** channel with Bacto A Mix.

The interpretation of results with **Bacto A Mix** is summarized in the following Table.

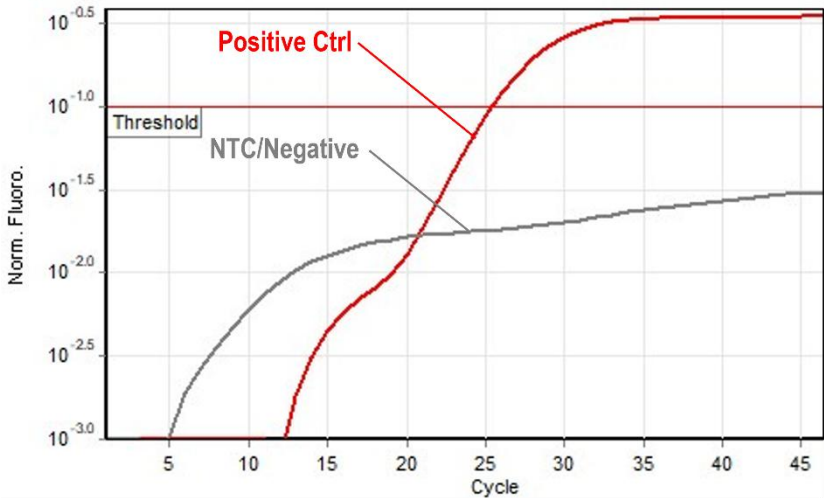
Bacto A Mix			
Green/ FAM	Yellow/ VIC	Red/ Cy5	Result
+	-/+	-	Pos for Mycobacterium tuberculosis
-	-/+	+	Pos for Streptococcus pneumoniae
-	+	-	Negative
-	-	-	Inconclusive

**B) Analysis of the sample results with Fungal A Mix:**

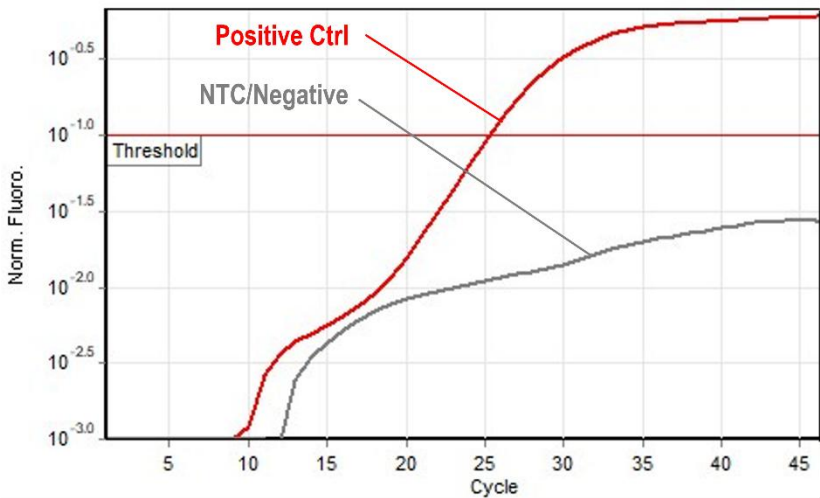
To analyze data of **Fungal A Mix** briefly, click on the analysis menu and then under Quantitation tab double click on cycling A. Green. Manually put threshold, at 0.1 for Green, Orange, Red and Yellow channels.

Figures 4, 5, 6 and 7 represent typical graphs with Fungal A Mix for Rotor-Gene.

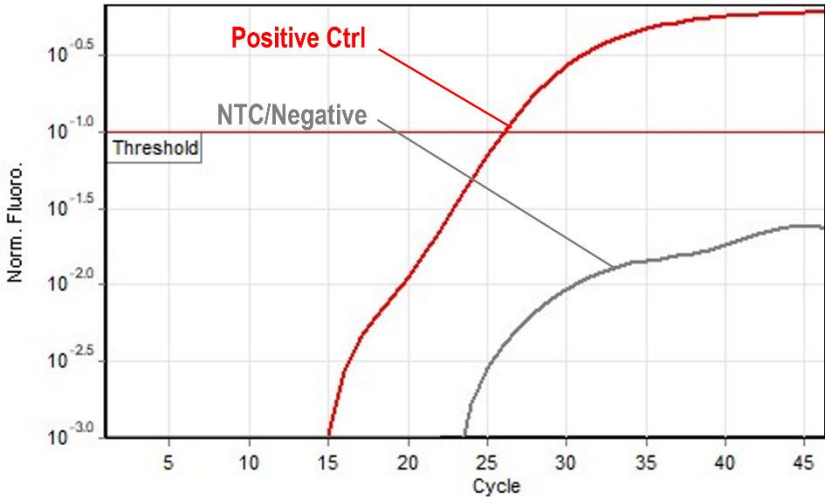
A signal with **Fungal A Mix** in the **Green** channel indicates **Cryptococcus neoformans**, in the **Orange** channel indicates **Candida albicans** and in the **Red** channel indicates **Aspergillus spp.** and, in the **Yellow** channel indicates **Pneumocystis Jirovecii**.



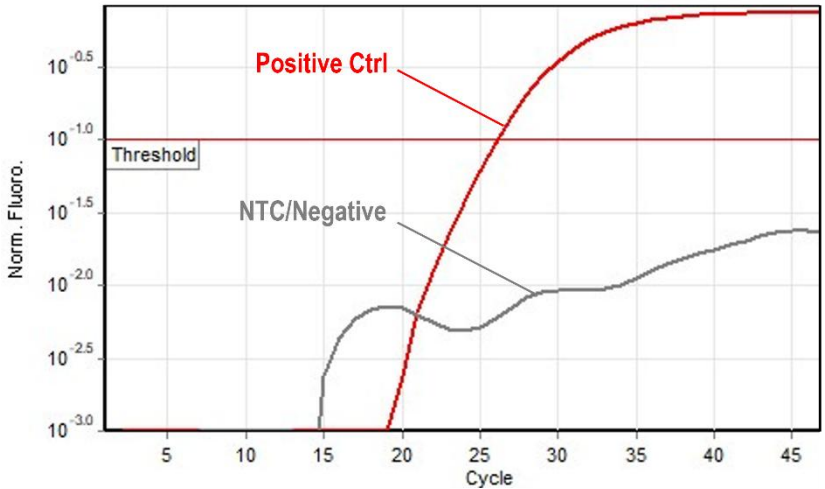
**Fig 4.** Typical Controls graph with Fungal A Mix in Green channel for Rotor-Gene (*Cryptococcus neoformans*)



**Fig 5.** Typical Controls graph with Fungal A in Yellow channel for Rotor-Gene (*Pneumocystis Jirovecii*)



**Fig 6.** Typical Controls graph with Fungal A Mix in Red channel for Rotor-Gene (*Aspergillus Spp*)



**Fig 7.** Typical Controls graph with Fungal A Mix in Orange channel for Rotor-Gene (*Candida albicans*)

**Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable**

Consider the following points when analyzing results with **Fungal A Mix:**

- A sample is **Positive** for Cryptococcus neoformans if it is positive in the **Green** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40.
- A sample is **Positive** for Candida albicans if it is positive with Fungal A Mix in the **Orange** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40.
- A sample is **Positive** for Aspergillus spp. if it is positive in the **Red** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40.
- A sample is **Positive** for Pneumocystis Jirovecii if it is positive in the **Yellow** channel with sigmoid graphs and CT of less than 40.
- A sample is **Negative** for Cryptococcus neoformans, Candida albicans, Aspergillus spp. and Pneumocystis Jirovecii if it is negative in the **Green**, the **Orange**, the **Red** and the **Yellow** channels with Fungal A Mix while IC is positive with Bacto A Mix in the **Yellow** channel with a sigmoid graph and CT of 28-32.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative with in all four channels with Fungal A Mix and Bacto A Mix.

The interpretation of results for Fungal A Mix is summarized in the following Table.

Fungal A Mix				
Green/ FAM	Yellow/ VIC	Red/ Cy5	Orange/ ROX	Result
+	-	-	-	Positive for <b>Cryptococcus neoformans</b>
-	+	-	-	Positive for <b>Pneumocystis Jirovecii</b>
-	-	+	-	Positive for <b>Aspergillus spp.</b>
-	-	-	+	Positive for <b>Candida albicans</b>
-	-	-	-	Negative if sample IC is <u>Positive</u>
-	-	-	-	Inconclusive (If sample is also Negative in all channels with Bacto A Mix)

### 19. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with the cloned targets genomes (partial) and showed a limit of detection equal to 1 copies/μl for Mycobacterium tuberculosis, 38 copies/μl for Streptococcus pneumoniae, 18 copies/μl for Cryptococcus neoformans, 87 copies/μl for Aspergillus spp., 21 copies/μl for Pneumocystis Jirovecii and 24 copies/μl for Candida albicans.

### 20. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special treatment before disposal and can be directly discarded. Infectious specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and

then discarded.

## 21. Technical Support

For technical support, contact us via

Phone: +98 993-6223241

Email: [info@novingene.com](mailto:info@novingene.com)

## 22. Contact Information

### NovinGene ParsVira

Address: No. 20, 4<sup>th</sup> St, Gisha St, Tehran, Iran 1446843434.

Tel: +98 21-88837393

+98 990 -1813124

Email: [info@novingene.com](mailto:info@novingene.com)










Website: [www.novingene.com](http://www.novingene.com)

## 23. References

- Alspaugh, J.A., 2015. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 78, pp.55-58.
- Bateman, M., Oladele, R. and Kolls, J.K., 2020. Diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a review of current methods and novel approaches. *Medical Mycology*, 58(8), pp.1015-1028.
- Fosses Vuong, M., Hollingshead, C.M. and Waymack, J.R., 2023. Aspergillosis. "
- Gagneux, S., 2018. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, 16(4), pp.202-213.
- Mackay IM., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 10 (3): 190 – 212.

- Narciso, A.R., Dookie, R., Nannapaneni, P., Normark, S. and Henriques-Normark, B., 2025. Streptococcus pneumoniae epidemiology, pathogenesis and control. Nature Reviews Microbiology, 23(4), pp.256-271.
- Prasad, R., 2017. Candida albicans. Springer International Publishing.

## 24. Symbols

 <b>RUO</b> Research use only	 <b>Manufacturer</b>	 <b>Consult instructions for use</b>
 <b>LOT</b> Lot number	 <b>Content sufficient for &lt;n&gt; tests</b>	 <b>Use-by date</b>
 <b>REF</b> Catalogue number	 <b>SN</b> Serial number	 <b>Temperature limit</b>

**For more information and resources please visit our website; [www.novingene.com](http://www.novingene.com)**