

Code: FAMTA.MA.IN.19

Rev: 05-01

Date: 1405/04



دفترچه راهنما

*famta*SCREEN HLA-B27 Real-Time PCR Kit

کیت تشخیص مولکولی HLA B27

به روش Real-Time PCR

Version 05-01



Cat. No:

2040220 (24 Reactions)

2040221 (48 Reactions)

2040222 (96 Reactions)



info@famta.co

www.famta.co



0939-188 3994

02122004254-5

صفحه	عنوان
۲	کاربرد
۲	مقدمه
۲	اساس آزمایش
۲	محتویات کیت
۳	مواد و تجهیزات لازم
۳	دستگاه های سازگار با کیت
۳	شرایط نگهداری کیت
۴	نمونه و شرایط نگهداری آن
۴	احتیاط ها و هشدار ها
۵	استخراج ژنوم
۵	آماده سازی واکنش
۵	اضافه کردن الگو
۶	تنظیم برنامه دستگاه
۷	تفسیر نتایج
۷	صحه گذاری
۸	حساسیت آنالیتیکال و بالینی
۸	اختصاصیت آنالیتیکال و بالینی
۸	مداخله گر ها
۹	پایداری
۹	عیب یابی
۱۰	علائم و اختصارات
۱۱	پشتیبانی

کاربرد

این کیت جهت شناسایی و تشخیص مولکولی HLA B27 (Human leukocyte Antigen) طراحی گردیده است.

مقدمه

کیت famtaSCREEN HLA B27 Real-Time PCR شرکت فام تن آزما با برند تجاری FAMTA (فَمَتا) یک کیت تشخیصی آزمایشگاهی مبتنی بر متد TaqMan Probe بوده که به منظور تشخیص مولکولی HLA B27 تولید گردیده است. تست دارای یک سیستم تکثیر هترولوگ (تکثیر ژن کنترل داخلی) جهت تعیین احتمال وجود ممانعت کننده‌های PCR و همچنین صحت عملکرد محلول های کیت می‌باشد.

پروپ اختصاصی HLA B27 با رنگ FAM (کانال سبز) و پروپ اختصاصی ژن کنترل داخلی (IC) با رنگ JOE (کانال زرد) نشان دار شده است.

استفاده از پروپ های متصل شده به رنگ های متفاوت، امکان تشخیص همزمان HLA B27 و کنترل داخلی را به دستگاه Real-Time PCR می‌دهد.

اساس آزمایش

کیت حاضر بر پایه واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی (Real-Time PCR) و با استفاده از پروپ های TaqMan طراحی گردیده است. در این روش، تکثیر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی صورت می‌گیرد. سیگنال ناشی از این تکثیر با استفاده از رنگ های فلورسنت متصل یافته به پروپ اختصاصی نمایش داده می‌شود. با افزایش میزان تکثیر محصول اختصاصی، شدت فلورسنت ساطع شده از پروپ افزایش یافته و نتایج به شکل یک نمودار سیگموییدی در دستگاه ریل تایم رویت می‌گردد. در این روش برخلاف روش PCR معمولی، نیازی به الکتروفورز محصول تکثیر یافته بر روی ژل آگاروز نمی‌باشد.

محتویات کیت

این کیت شامل یک راهنمای سریع به صورت کاغذی و موارد زیر به عنوان اجزاء تشکیل دهنده کیت می‌باشد.

جدول ۱) محتویات کیت

Color	Title	Volume per vial	No. of vials 24 Reactions	No. of vials 48 Reactions	No. of vials 96 Reactions
Blue	HLA B27 Master Mix	520 µl	1	2	4
Red	Positive Control	100 µl	1	1	2
White	Negative Control	100 µl	1	1	2
White	DDW	600 µl	1	1	2

۱. میکس اصلی حاوی بافر، آنزیم، پرایمرها و پروپ های ژن هدف و کنترل داخلی

۲. حاوی ژنوم HLA B27

۳. حاوی ژنوم کنترل داخلی

۴. آب DNase-RNase Free

مواد و تجهیزات لازم

- ✓ دستگاه Real-Time PCR که دارای رنگ های خوانش FAM و JOE باشد.
- ✓ هود زیستی کلاس II و Workstation
- ✓ بلوک های آلومینیومی (Ice Racks) که از قبل در یخچال قرار گرفته و سرد باشند.
- ✓ سمپلر های متغیر (0.5-10 µL و 10-100 µL)
- ✓ سر سمپلر فیلتردار DNase-RNase Free
- ✓ میکروتیوب 1.5 ml، DNase-RNase Free
- ✓ میکروتیوب های مخصوص PCR
- ✓ دستگاه مینی اسپین ورتکس
- ✓ کیت استخراج DNA ژنومیک
- ✓ دستکش لاتکس بدون پودر
- ✓ روپوش های آزمایشگاهی
- ✓ خودکار علامت گذاری

دستگاه های سازگار با کیت

این کیت بر روی دستگاه ریل تایم پی سی آر Rotor-Gene Q شرکت QIAGEN ارزیابی شده است و در تمامی دستگاه های Real time PCR که دارای دو کانال خوانش سبز (رنگ FAM) و زرد (رنگ JOE) باشند قابل استفاده است.

شرایط نگهداری کیت

کیت را تا زمان انقضا که بر روی کیت درج شده است در فریز ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمایید. از مخلوط کردن محلولها و موادی که شماره سریال (Lot Number) متفاوت دارند خودداری نمایید و از کیتی که تاریخ انقضای آن گذشته است استفاده نکنید. کیت به همراه یخ خشک ارسال می شود. دقت کنید که اجزای کیت پس از دریافت منجمد بوده و از نظر ظاهری نیز سالم باشند.

ذوب مکرر (بیشتر از ۳ بار) اجزای کیت ممکن است بر عملکرد سنجش تاثیر بگذارد به همین منظور در ابتدا، اجزای کیت را تقسیم (Aliquot) کنید.

در صورت نگهداری کیت مطابق با شرایط فوق، ترکیبات آن به مدت ۱۲ ماه پایدار خواهند بود.

نمونه و شرایط نگهداری آن

نمونه مناسب جهت انجام آزمون HLA B27، خون تام است. نمونه خون باید در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شده و بعد از جداسازی، بلافاصله نسبت به استخراج ژنوم اقدام گردد.

در صورتی که امکان استخراج ژنوم فراهم نباشد نمونه خون باید تا زمان استخراج در فریزر ۲۴- درجه سانتیگراد نگهداری شود.

پیشنهاد می‌شود قبل از فریز کردن، نمونه‌ی خون تام را در دو حجم 200 µL جهت انجام تست و احیاناً تکرار آن، و یک حجم 1000 µL جهت Backup، در میکروتیوب های 1.5 mL DNase-RNase Free جداسازی نمایید.

به هیچ وجه از نمونه حاوی هپارین و EDTA در غلظت های بالا استفاده نشود.

نمونه هایی که به صورت زیر باشند، کیفیت لازم جهت استفاده برای تست HLA B27 را دارا نمی باشند:

- ۱- نمونه هایی که خون آنها همولیز شده باشد.
- ۲- نمونه هایی که در اطراف لوله نمونه گیری لکه های خون مشاهده گردد.
- ۳- نمونه هایی که بیش از دو ساعت در دمای محیط نگهداری شده باشند.
- ۴- نمونه هایی که بیش از ۱۲ ساعت در دمای یخچال نگهداری شوند.
- ۵- نمونه هایی که بیش از ۲ سال در دمای ۲۰- نگهداری شده باشد.

احتیاط ها و هشدارها

این کیت در مصارف تشخیصی کاربرد دارد. استناد به نتایج این کیت بدون استفاده از سایر داده های بالینی، آزمایشگاهی و پاراکلینیکی توصیه نمی شود.

رعایت اقدامات ایمنی عمومی در هنگام کار با نمونه های عفونی، محلول ها و ریجنتها الزامیست. قبل از انجام آزمون دستکش لاتکس بدون پودر پوشیده و با استفاده از یک گاز استریل آغشته به وایتکس ۱۰٪ سطوح کاری را تمیز و ضد عفونی نمایید. در پایان دستکش و گاز استریل را دور انداخته و دستکش جدیدی پوشیده و با گاز استریل آغشته به الکل ۷۰٪ سطوح کاری را کاملاً پاک و ضد عفونی نمایید. سپس به مدت حداقل ۲۰ دقیقه لامپ UV هود و یا Workstation را روشن نموده تا فضای زیر آن ضد عفونی گردد.

استفاده از کیت باید توسط افرادی که آشنایی کامل با اصول و روش های تشخیص مولکولی Real-Time PCR همچنین توانایی آنالیز و تفسیر داده ها را داشته باشند، انجام پذیرد.

به دلیل حضور پروب های دارای فلورسنت در ویال مستر میکس، از تماس نور مستقیم با مخلوط واکنش جلوگیری نمایید و تمامی مراحل آماده سازی و انجام مراحل تست را در شرایط بدون نور انجام دهید.

مقررات کار با نمونه های عفونی باید بر اساس رعایت اصول صحیح آزمایشگاهی (GLP) انجام گیرد.

جهت جلوگیری از بروز آلودگی حین کار (Carry over contamination) استفاده از مکان های مجزا جهت آماده سازی و انجام واکنش ضروری است.

از سه اتاق مجزا برای عملیات هایی نظیر استخراج نمونه، آماده سازی واکنش ها و فرایند تکثیر استفاده کنید.

تست را دقیقاً مطابق با پروتکل ارائه شده در دفترچه ی راهنما کیت انجام دهید. از تغییر دادن حجم واکنش خودداری نمایید، زیرا سبب کاهش حساسیت کیت می گردد.

روش استخراج ژنوم

نمونه ی خون را از فریزر خارج کرده و اجازه دهید تا در دمای اتاق ذوب شود. سپس آن را مدت کوتاهی ورتکس و اسپین نمایید. سپس مقدار 200 µL از خون بیمار را در یک میکروتیوب 1.5 mL ریخته و با استفاده از کیت و یا دستگاه های استخراج اتوماتیک، DNA را از نمونه استخراج نمایید.

- در هر آزمون یک نمونه منفی را نیز جهت کنترل، استخراج کنید.
- بهتر است حجم Elution Buffer نهایی 100-150 µL باشد.
- DNA استخراج شده را می توان تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود

جدول ۲) جدول مشخصات DNA

ویرژگی DNA	مناسب DNA	نامناسب DNA
غلظت	20 - 50 ng	کمتر از 10 یا بیشتر از 100 ng
نسبت A260/A280	1.8 - 2.0	کمتر از 1.7
نسبت A260/A230	≥ 2	کمتر از 2

آماده سازی واکنش

از کالیبره بودن سمبرها قبل از آماده سازی واکنش اطمینان حاصل نمایید. بر اساس تعداد واکنش هایی که میخواهید انجام دهید ویال های کیت شامل Master Mix، Positive Control، Negative Control و DDW را از فریزر خارج کرده و اجازه دهید تا بر روی Ice Rack به تدریج ذوب شوند و پس از اطمینان از ذوب شدن، ویال ها را به طور مختصر ورتکس و سپس اسپین نمایید.

جهت اطمینان از نتایج به دست آمده از نمونه ها تست را به صورت دوتایی (Duplicate) ران نمایید. اینکار به خصوص در مورد نمونه هایی که به طور نامناسب استخراج شده باشند و یا اگر DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار نباشد، ضروری است.

برای هر ران کاری حتماً از هر دو کنترل مثبت، و منفی استفاده نمایید.

اضافه کردن الگو

مستر میکس را به کمک پیپتینگ و یا ورتکس آرام، هموژن و سپس اسپین نمایید.

مقدار 20 µL از مستر میکس را به میکروتیوب ها که بر روی بلوک آلومینیومی سرد شده (Ice Rack) قرار دارند اضافه نمایید.

مقدار 5 µL از DNA استخراج شده (برای بیماران)، همچنین کنترل منفی و کنترل مثبت را در میکروتیوب های مربوطه اضافه کنید.

نکته: برای جلوگیری از آلودگی حین کار به ترتیب لوله NTC، کنترل منفی، نمونه‌های بیماران و سپس لوله ی کنترل مثبت را آماده نمایید.

سپس بلوک آلومینیومی سرد (Ice Rack) را به اتاقی که دستگاه Real-Time PCR قرار دارد منتقل کنید.

نکته: بهتر است برنامه دمایی قبل از آماده کردن مستر میکس و اضافه کردن الگو، تنظیم گردد.

تنظیم برنامه دستگاه

دستگاه های Real-Time PCR که دارای رنگ های خوانش FAM و JOE باشند، جهت استفاده با کیت حاضر مناسب هستند. در دستگاه ABI 7500 رنگ های آلترناتیو JOE، HEX یا VIC می‌باشند. در انتخاب دتکتورها دقت کنید.

رنگ فلورسنت جهت گزارشگر (Reporter) FAM، HLA B27 و رنگ فلورسنت جهت گزارشگر (Reporter) کنترل داخلی، JOE می‌باشد.

برنامه دمایی برای آزمون Real-Time PCR جهت دستگاه Rotor Gene

جدول ۳) برنامه دمایی دستگاه Rotor Gene

	Temperature	Hold	Acquisition	Cycle
Initial denaturation and polymerase activation	95°C	15 min	-----	1X
Denaturation	95°C	20 sec	-----	40X
Annealing and elongation	60°C	60 sec	Green, Yellow	

تنظیمات اختصاصی دستگاه Rotor Gene Q جهت بهینه سازی خوانش:

Gain optimization:

Optimize Acquiring → perform optimization before 1st Acquisition

برنامه دمایی برای آزمون Real-Time PCR جهت دستگاه های بلاک

جدول ۴) برنامه دمایی دستگاه های بلاک

	Temperature	Hold	Acquisition	Cycle
Initial denaturation and polymerase activation	95°C	15 min	-----	1X
Denaturation	95°C	20 sec	-----	40X
Annealing	64°C	25 sec	-----	
Elongation	72°C	10 sec	Green, Yellow	

تفسیر نتایج

در نرم افزار دستگاه Rotor Gene Q منوی Analysis گزینه Quantitation را انتخاب کرده و روی Cycling A. Green کلیک کنید و Threshold را روی 0.05 قرار دهید. سپس روی Cycling A. Yellow کلیک کرده و Threshold را روی 0.05 قرار دهید.

از نوار بالای پنجره Quantitation Analysis، گزینه‌های Dynamic Tube و Slope Correct را روشن نموده و گزینه Outlier Removal (جهت مماس کردن نمودار NTC با خط صفر) را در بازه‌ی ۱ تا ۱۰ درصد تنظیم نمایید. فلورسنت سبز (Green) مربوط به HLA B27 و فلورسنت زرد (Yellow) مربوط به کنترل داخلی (IC) می باشد.

در صورتیکه نمونه در کانال سبز دارای منحنی سیگموئیدی بوده و Ct آن کمتر از ۳۲ باشد و در کانال زرد دارای منحنی سیگموئیدی و Ct ۲۰ تا ۳۰ باشد، نمونه مثبت می باشد.

در صورتیکه نمونه در کانال سبز فاقد منحنی سیگموئیدی باشد و در کانال زرد دارای منحنی سیگموئیدی بوده و Ct آن بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، نمونه منفی می باشد.

در صورتیکه نمونه در کانال سبز و زرد فاقد منحنی سیگموئیدی باشد، استخراج نمونه و سپس تست را تکرار کنید.
توجه: نمونه‌ی کنترل مثبت فاقد ژنوم کنترل داخلی بوده و منحنی سیگموئیدی در کانال زرد مربوط به این نمونه مشاهده نمی گردد.

توجه: دقت نمایید که شرط دارا بودن شکل سیگموئیدی برای تفسیر نتایج نمودار ضروری است. در صورتیکه نمودار دارای شکل سیگموئیدی نباشد، در دستگاه Rotor Gene Q می توانید گزینه Slope correction را خاموش نموده و سپس اقدام به آنالیز نتایج نمایید.

جدول ۵) تفسیر نتایج یک آزمون

Detection Channel		Result Interpretation
FAM (HLA B27, Target)	JOE (Internal Control)	-----
Positive	Positive or Negative	HLA B27 DNA detected
Negative	Positive	HLA B27 not detected . The sample is negative
Negative	Negative	PCR inhibition or reagent failure. Repeat test or Extraction again.

*کیت حاضر قادر به شناسایی آلل های زیر از HLA-B27 نمی باشد:

HLA-B 27:09, 27:11, 27:14, 27:19, 27:21, 27:22, 27:30, 27:43, 27:90, 27:102, 27:130, 27:153, 27:219

صحه گذاری

آزمون های اعتبارسنجی کیت حاضر، مطابق با راهنمای صحه گذاری تولید کیت های حوزه پزشکی آزمایشگاهی اداره کل تجهیزات پزشکی انجام شده است که نتایج آن به شرح زیر است:

حساسیت آنالیتیکال و بالینی (Sensitivity)

حساسیت آنالیتیکال کیت حاضر با محاسبه میزان LOD کیت ارزیابی گردید. بدین منظور رقت های متوالی از کمینه میزان DNA ژنومی استخراج شده ی بیمار تهیه گردید. بر مبنای نتایج حاصله، کمترین میزان حد تشخیص کیت حاضر برای شناسایی با دامنه اطمینان ۹۵ درصد، معادل مقدار DNA ۰.۱ نانوگرم بر میکرولیتر است. بدین معنی که با احتمال ۹۵ درصد، این میزان DNA استخراج شده از بیمار قابلیت شناسایی با کیت حاضر را دارد. حساسیت بالینی کیت نیز با توجه به نتایج بالینی حاصل از آزمون بر روی ۲۰۰ نمونه بیمار دارای ژن HLA B27 به میزان ۱۰۰ درصد تعیین گردید.

اختصاصیت آنالیتیکال و بالینی (Specificity)

با توجه به نتایج بالینی انجام شده بر روی ۲۰۰ نمونه بیمار فاقد ژن HLA B27، کیت حاضر دارای اختصاصیت ۱۰۰ درصد می باشد. نتایج حاصل از این آزمون، توسط آنالیزهای بیوانفورماتیک نیز تایید گردیده است.

مداخله گر ها (Interference)

با توجه به تست های انجام شده بر روی تکرارهای سه تایی از نمونه هایی که دارای مواد مداخله گر احتمالی در فرایند آزمون Real-Time PCR می باشند، نتایج نشان می دهد که مواد مداخله گر به میزان اعلام شده در جدول زیر اثر مهارکنندگی بر روی تست ندارند. استفاده از نمونه هایی که دارای مقادیر بیشتر از اعداد اعلام شده در جدول زیر باشند، توصیه نمی شود.

جدول ۶) مواد مداخله کننده

ماده مداخله کننده و غلظت آن
هموگلوبین ۲۰ گرم بر دسی لیتر
EDTA با غلظت ۱.۸ میلی گرم بر میلی لیتر
سیترات سدیم ۰.۰۱ مولار
تری گلیسرید ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر
آلبومین با غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر
بیلی روبین ۰.۶ میلی گرم بر دسی لیتر
هپارین ۰.۰۵ واحد بر میلی لیتر
سدیم کلرید ۱۵۰ میلی مولار
ایزوپروپانول ۵ درصد حجمی/حجمی

پایداری (Stability)

دمای نگهداری کیت حاضر ۲۰- درجه سانتی گراد می باشد. در صورت نگهداری کیت در دمای ذکر شده، محتویات کیت تا حداقل ۱۲ ماه پایدار می باشند. جهت حفظ پایداری بهینه، اکیدا توصیه می شود نگهداری کیت مطابق با شرایط اعلام شده در دفترچه صورت پذیرد. در غیر این صورت، جهت راهنمایی بیشتر لطفا با کارشناسان ما تماس حاصل فرمایید.

عیب یابی (Troubleshooting)

در صورتی که هیچ سیگنالی در میکروتیوب مربوط به کنترل مثبت خوانده نشود:
علل احتمالی:

- نمونه ی کنترل مثبت به تیوب مربوطه اضافه نشده است.
- کانال های انتخاب شده مطابق با SOP نمی باشند.
- پروفایل دمایی انتخاب شده مطابق با SOP نمی باشد.
- میکس نکردن و یا میکس ناکافی نمونه ی کنترل مثبت.
- رعایت نشدن شرایط نگهداری یکی یا بیشتر اجزاء کیت و یا اتمام تاریخ اعتبار کیت

راه حل:

- آزمون را دوبار تکرار کرده، کنترل مثبت را به آرامی و رتکس و سپس اسپین نموده و عمل پیپتینگ را به درستی انجام دهید.

دریافت منحنی تکثیر در نمونه NTC و NC جهت توالی هدف (HLA B27):

علل احتمالی:

- آلودگی در فضای کار و یا ریجنت های کیت اتفاق افتاده است.

راه حل:

- فضای کار، سمپلر ها و ... را مطابق SOP مربوطه تمیز کرده و لامپ های UV زیر ورک استیشن ها و اتاق را به مدت حداقل ۲۰ دقیقه روشن نمایید، ریجنت های آلوده شده را دور ریخته و از ریجنت های جدید استفاده کنید.

علائم و اختصارات:

علائم موجود بر روی لیبل کیت به شرح زیر است:

ردیف	علائم	توضیحات	ردیف	علائم	توضیحات
۱		نام و آدرس تولید کننده	۶		تاریخ تولید
۲		جهت تشخیص آزمایشگاهی	۷		تعداد تست موجود
۳		دستورالعمل استفاده	۸		شماره کاتالوگ تولید کننده
۴		شماره سری تولید	۹		تاریخ انقضاء
۵		احتیاط	۱۰		حد بالا و پایین دمای نگهداری

یادداشت:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

همکار گرامی:

در صورت هر گونه سوال و اشکال با کارشناسان شرکت فمتا تماس حاصل فرمایید.

شماره تلفن پشتیبانی: ۰۹۰۴ ۴۷۳ ۹۰۰۰

ایمیل پشتیبانی: support@famta.co