

Code: FAMTA.MA.IN.29

Rev: 05-00

Date: 1405/04



دفترچه راهنما

*famta*SCREEN MTB Complex Real-Time PCR Kit

کیت تشخیص مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

به روش Real-Time PCR

Version 05-00



Cat. No:

2040250 (24 Reactions)

2040251 (48 Reactions)

2040252 (96 Reactions)



info@famta.co



www.famta.co



0939-188 3994



02122004254-5

صفحه	عنوان
۱.....	مقدمه
۱.....	محتویات کیت
۱.....	شرایط نگهداری
2.....	مواد و تجهیزات لازم
۲.....	مشخصات محصول
2.....	دستگاه های Real-Time PCR
۳.....	نمونه و شرایط نگهداری آن
۳.....	احتیاط ها و هشدار ها
۴.....	روش استخراج ژنوم
۴.....	آماده سازی واکنش
۵.....	اضافه کردن الگو
۵.....	تنظیم برنامه دستگاه
۶.....	اعتبار سنجی آزمون (Assay Validation)
۶.....	تفسیر نتایج (Result Interpretation)
۸.....	عملکرد کیت (Kit Performance)
۸.....	حساسیت بالینی (Clinical Sensitivity)
۸.....	حساسیت تشخیصی (Analytical Sensitivity)
۸.....	اختصاصیت (Specificity)
۱۰.....	عیب یابی (Troubleshooting)
۱۱.....	نماد ها

مقدمه

بیماری عفونی توبرکولوز (Tuberculosis) یکی از بزرگترین مشکلات بهداشتی دنیا است که سالانه موجب مرگ بیش از دو میلیون نفر می شود. عامل این بیماری گروهی از باکتری های درون سلولی هستند که مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس (Mycobacterium tuberculosis complex) نامیده می شوند. مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (M. Tuberculosis)، مایکوباکتریوم بوویس (M. bovis) و مایکوباکتریوم بوویس ب ژ (M. bovis BCG) از جمله این باکتری ها می باشند.

کیت تشخیص famtaSCREEN MTB Complex Real-Time PCR به منظور تشخیص کیفی MTB تولید گردیده است.

کیت ها بر اساس تعداد تست قابل انجام در هر کیت بصورت ۲۴، ۴۸ و ۹۶ تستی طراحی شده اند.

محتویات کیت

Color	Title	Volume per vial	No. of vials 24 Reactions	No. of vials 48 Reactions	No. of vials 96 Reactions
Blue	PCR Buffer Mix ¹	260 µl	1	2	4
Purple	Primers & Probes ²	130 µl	1	2	4
Red	Positive Control ³	60 µl	1	1	2
Green	Internal Control ⁴	650 µl	1	1	2
White	DDW ⁵	600 µl	1	1	2

۱- بافر میکس

۲- حاوی پرایمرها و پروب های MTB Complex و کنترل داخلی

۳- حاوی ژنوم MTB Complex

۴- IC (Internal Control): حاوی ژنوم کنترل داخلی

۵- DDW: آب DNase-RNase Free

شرایط نگهداری

کیت را تا زمان انقضا 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 ۲ بار) اجزای کیت ممکن است بر عملکرد سنجش تاثیر بگذارد به همین منظور در ابتدا اجزای کیت را Aliquot کنید.

مواد و تجهیزات لازم

- ✓ دستگاه Real-Time PCR که دارای رنگ های خوانش FAM و JOE باشد.
- ✓ بلوک های آلومینیومی (Ice Racks) که از قبل در یخچال قرار گرفته و سرد باشند.
- ✓ سمپلرهای متغیر ($0.5-10 \mu\text{L}$ و $10-100 \mu\text{L}$)
- ✓ سر سمپلر فیلتردار DNase-RNase Free
- ✓ میکروتیوب 1.5 ml ، DNase-RNase Free
- ✓ میکروتیوب های مخصوص PCR
- ✓ دستگاه مینی اسپین ورتکس
- ✓ کیت استخراج DNA باکتری
- ✓ دستکش لاتکس بدون پودر

مشخصات محصول

کیت *famtaSCREEN MTB Complex Real-Time PCR*، یک کیت تشخیصی آزمایشگاهی مبتنی بر متد TaqMan Probe بوده، که به منظور تشخیص و تعیین میزان DNA اختصاصی MTB تولید گردیده است. تست دارای یک سیستم تکثیر هترولوگ (تکثیر ژن کنترل داخلی) جهت تعیین احتمال وجود ممانعت کننده های PCR و همچنین صحت عملکرد محلول های کیت می باشد.

پروپ اختصاصی DNA MTB 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 DNA اختصاصی MTB و کنترل داخلی را به دستگاه Real-Time PCR می دهد.

دستگاه های Real-Time PCR

کیت *famtaSCREEN MTB Complex Real-Time PCR*، جهت انجام تست با دستگاه های زیر طراحی گردیده است:

- ✓ Rotor Gene 6000
- ✓ Rotor Gene Q
- ✓ MIC (Bio Molecular System)
- ✓ LightCycler 96 (Roche)
- ✓ ABI StepOne and StepOne Plus (Applied Bio Systems)
- ✓ SLAN
- ✓ Gentier 48/96 (Tian Long)

نمونه و شرایط نگهداری آن

نمونه مناسب جهت انجام آزمون MTB, Sputum, Plevral fluid, Urine, Whole Blood, Tissue و... است. نمونه خون بیمار باید در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شده و بلافاصله نسبت به استخراج ژنوم اقدام گردد.

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

پیشنهاد می‌شود قبل از فریز کردن، نمونه ی بیمار 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 خون حاوی هپارین و EDTA در غلظت های بالا استفاده نشود.

احتیاط و هشدار ها

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

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.

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. هرگز درب ویال های تکثیر شده را باز نکنید. بعد از اتمام آزمون فوراً ویال های تکثیر شده را از دستگاه Real-Time PCR خارج نموده و در ظرف محتوی هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ قرار داده و نسبت به اتوکلاو آن اقدام و در فضایی خارج از آزمایشگاه معدوم نمایید.

سمپلرها را هر ۶ ماه یک بار کالیبره نمایید و از سر سمپلرهای فیلتردار و DNase-RNase Free استفاده نمایید. در صورت بروز هرگونه سوال در مورد انجام آزمون ابتدا به دقت دستورالعمل کیت را مطالعه نموده و سپس با کارشناس فنی شرکت فام تن آزما تماس حاصل نمایید.

چنانچه نمونه های آزمایشگاه شما به تعداد کافی نمیباشند، به محض دریافت کیت آن را در حجم های کمتر Aliquot کرده و تا زمان استفاده، در فریزر و دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

روش استخراج ژنوم

توصیه می شود برای استخراج DNA باکتری از کیت های استخراج استاندارد و از برندهای معتبر، یا از دستگاه های استخراج اتوماتیک از کمپانی های معتبر استفاده گردد.

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

کیت های مخصوص استخراج ژنوم مایکوباکتریوم و یا کیت استخراج QIAamp DNA Blood mini Kit (کمپانی کیاژن) جهت استخراج DNA باکتری توصیه می گردد.

توجه: برای اطمینان از صحت نتایج منفی بیماران، ارزیابی عدم حضور ممانعت کننده های واکنش PCR و اطمینان از کیفیت استخراج، 12 µL از کنترل داخلی (IC) را در هنگام استخراج به Lysate (مخلوط بافر لیز کننده و نمونه) اضافه نمایید.

هرگز کنترل داخلی را مستقیماً به نمونه اضافه نکنید.

در هر آزمون یک نمونه منفی را نیز جهت کنترل، استخراج کنید.

تا زمان انجام آزمایش می توان DNA استخراج شده را در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهدار نمود.

آماده سازی واکنش ها

تهیه مستر میکس

بر اساس تعداد واکنش هایی که میخواهید انجام دهید ویال های کیت شامل PCR Buffer Mix، Primers & Internal Control، Positive Control، Probes 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 نموده و بر اساس جداول زیر نسبت به تهیه مستر میکس اقدام کنید.

تهیه مستر میکس به دو صورت انجام می شود:

اگر کنترل داخلی جهت اطمینان از عدم حضور ممانعت کننده های PCR بکار می رود مستر میکس را بر اساس جدول 2 تهیه نمایید.

جدول ۲) آماده سازی میکس PCR به همراه کنترل داخلی

Number of Reactions (rxns)	1
PCR Buffer Mix	10 µL
Primers & Probes	5 µL
Internal Control	2 µL
Master Mix Volume	15 µL

اگر کنترل داخلی جهت کنترل مرحله استخراج و اطمینان از عدم حضور ممانعت کننده های PCR بکار می رود، ژنوم کنترل داخلی میبایست در هنگام استخراج اسید نوکلئیک به نمونه خون اضافه شده باشد (قبلا در دفترچه توضیح داده شد). در این صورت مستر میکس را بر اساس جدول ۳ تهیه نمایید.

جدول ۳) آماده سازی میکس PCR بدون کنترل داخلی

Number of Reactions (rxns)	1
PCR buffer Mix	10 µL
Primers & Probes	5 µL
Master Mix Volume	15 µL

اضافه کردن الگو

مستر میکس آماده شده را به کمک پپیتینگ و یا ورتکس آرام، هموزن و سپس اسپین نمایید.

مقدار 15 µL از مستر میکس تهیه شده را به میکرو تیوب ها که بر روی بلوک آلومینیومی سرد شده (Ice Rack) قرار دارند اضافه نمایید.

مقدار 10 µL از DNA استخراج شده (برای بیماران)، همچنین کنترل مثبت را در میکرو تیوب های مربوطه اضافه کنید.

نکته: برای جلوگیری از آلودگی حین کار به ترتیب میکرو تیوب NTC، نمونه های بیماران و سپس میکرو تیوب کنترل مثبت را آماده نمایید.

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

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 می باشند.

در انتخاب دتکتورها دقت کنید.

رنگ فلورسنت جهت گزارشگر FAM, MTB Complex (Reporter) است و رنگ فلورسنت جهت گزارشگر (Reporter) کنترل داخلی، JOE است.

برنامه دمایی برای آزمون Real-Time PCR

جدول (۴) برنامه دمایی

	Temperature	Hold	Acquisition	Cycle
Initial denaturation and polymerase activation	95°C	15 min	-----	1X
Denaturation	95°C	20 sec	-----	45X
Annealing and elongation	60°C	40 sec	yes	

تنظیمات اختصاصی دستگاه Rotorgene جهت بهینه سازی خوانش:

Gain optimization:

Optimize Acquiring → perform optimization before 1st Acquisition

اعتبار سنجی آزمون (Assay Validation)

خط Threshold را با رعایت اصول زیر رسم نمایید:

خط Threshold را روی 0.05 و یا در صورتی که نتایج بهتری حاصل می شود به صورت دستی و در

ناحیه ای بالاتر از فلورسنت پایه و در محدوده ی خطی نمودار تنظیم نمایید.

تمام کنترل منفی ها (NTC and Negative Control) باید زیر خط Threshold قرار گیرند.

اگر آلودگی مشاهده شود (وجود منحنی تکثیر "Amplification plot" در نمونه NTC)، نتایج حاصل از آزمون

قابل تفسیر نبوده و باید کل ران تکرار شود.

نمونه های کنترل می بایست در کانال (رنگ) مربوطه دارای سیگنال باشند.

تفسیر نتایج (Result Interpretation)

نمونه های مثبت و همچنین کنترل مثبت کیت باید منحنی تکثیر سیگموئیدی را نشان دهند. در صورتیکه نمونه

بیمار دارای منحنی سیگموئیدی بوده و Ct کمتر از ۴۰ داشته باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن نمونه جهت

تکثیر کنترل داخلی، مثبت تلقی می شود. در صورتیکه نمونه بیمار فاقد منحنی تکثیر برای باکتری های MTB

Complex بوده ولی دارای منحنی تکثیر برای کنترل داخلی با Ct بین ۲۹ تا ۳۵ باشد این نمونه منفی در نظر

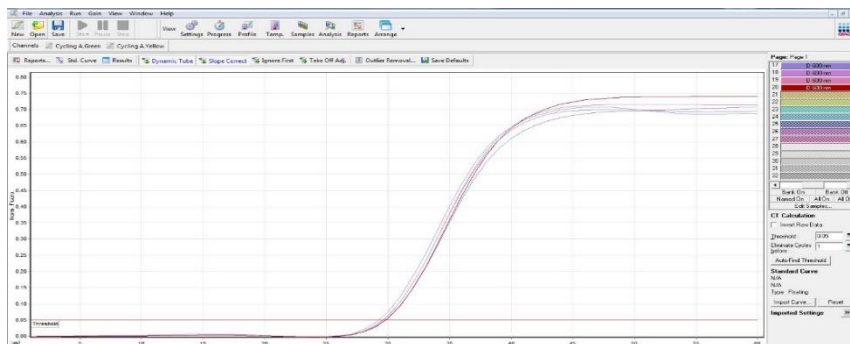
گرفته می شود. در صورتیکه نمونه بیمار فاقد منحنی تکثیر برای هر دو کانال سبز و زرد باشد، آزمایش آن نمونه

می بایست تکرار شود.

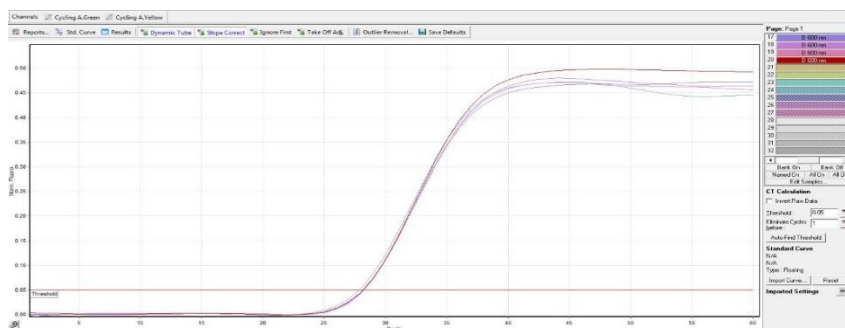
توجه: دقت نمایید که شرط دارا بودن شکل سیگموئیدی برای تفسیر نتایج نمودار ضروری است. در دستگاه

RotorGene Q می توانید جهت اصلاح شیب نمودار ها و مشاهده ی نمودارهای سیگموئیدی، گزینه ی Slope

correction را روشن و یا خاموش نمایید.



عکس ۱) آنالیز منحنی تکثیر نمونه کنترل مثبت توسط نرم افزار دستگاه Rotor Gene Q, 5Plex HRM



عکس ۲) نمودار تکثیر جهت کنترل داخلی (IC)

جدول ۵) الگوی نمودار تکثیر کنترل های یک آزمون معتبر

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

توجه: در مواردی که تعداد کپی MTB Complex در نمونه بیمار بیشتر از 250,000 copy/μL باشد، ممکن است منحنی کنترل داخلی در آن نمونه دیده نشود.

عملکرد کیت (Kit Performance)**دامنه خطی (Kit Dynamic Range)**

خطی بودن آزمون، با آنالیز سریال رقت با اختلاف ده برابر بصورت ۶ لگاریتم از غلظت الگو از 10^6 IU/μL تا 10 IU/μL کپی از غلظت الگو خطی در واکنش است.

حساسیت تشخیصی (Analytical Sensitivity)

کمترین حد تشخیصی این کیت برای ۲۰ بار تکرار از کمترین تیترا باکتری، معادل ۱ کپی از باکتری در یک واکنش بود که با اطمینان بیش از ۹۵٪ تشخیص داده شد.

اختصاصیت (Specificity)**اختصاصیت آنالیتیکی (Analytical Specificity)**

این کیت بر اساس توالی ژنی محافظت شده MTB Complex طراحی شده و قابلیت تشخیص بالایی برای توالی ژن مورد نظر دارد این کیت هیچ واکنش متقاطع با سایر باکتری ها و ویروس ها ندارد. برای این منظور آزمون Real-Time PCR با استفاده از این کیت بر روی نمونه های استخراج شده ارگانیسم های زیر انجام شد و هیچ نتیجه مثبتی مشاهده نگردید.

جدول ۸) نتایج آزمون اختصاصیت

Virus / bacteria / parasite	strain	source	Concentration	CT value
HSV-1		Clinical sample	6×10^7 copies/mL	Undetected
HSV-2		Clinical sample	6×10^7 copies/mL	Undetected
CMV		Clinical sample	6×10^7 copies/mL	Undetected
Brucella spp.		Clinical sample	3×10^3 copies/mL	Undetected
Salmonella spp.		Clinical sample	3×10^3 copies/mL	Undetected
JCV		Clinical sample	6×10^7 copies/mL	Undetected
VZV		Clinical sample	6×10^7 copies/mL	Undetected
EBV		Clinical sample	6×10^7 copies/mL	Undetected
Haemophilus influenzae		Clinical sample	3×10^3 copies/mL	Undetected
Mycoplasma pneumoniae		Clinical sample	3×10^3 copies/mL	Undetected

عیب یابی (Troubleshooting)

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

- نمونه‌ی کنترل مثبت به میکروتیوب مربوطه اضافه نشده است.
- کانال‌های انتخاب شده مطابق با SOP نمی باشند.
- پروفایل دمایی انتخاب شده مطابق با SOP نمی باشد.
- میکس نکردن و یا میکس ناکافی نمونه‌های کنترل مثبت.
- کالیبر نبودن سمپلرها و استفاده از سمپلر هایی با برندهای متفاوت
- رعایت نشدن شرایط نگهداری یکی یا بیشتر اجزاء کیت و یا اتمام تاریخ اعتبار کیت

راه حل:

- سمپلرها را کالیبر نموده و تمام سائزهای سمپلر را از یک برند انتخاب نمایید.
- آزمون را دوبار تکرار کرده، ریجنت ها را ورتکس و سپس اسپین نموده و عمل پیپتینگ را به درستی انجام دهید.

دریافت منحنی تکثیر در نمونه NTC و NC جهت توالی هدف (MTB Complex):

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.

نماد ها

جدول (۱۰) نماد ها

	شماره کاتالوگ / رفرنس		دفترچه راهنما
	لات نامبر		جهت مصارف تحقیقاتی
	شرکت تولید کننده		تاریخ تولید
	تعداد واکنش در هر کیت		دمای نگهداری
	تاریخ انقضا		

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