



famtaSCREEN MTB Complex Real-Time PCR Kit

کیت تشخیص مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش Real-Time PCR

راهنمای سریع

Cat Number: 2040250 (24 Reactions)
2040251 (48 Reactions)
2040250 (96 Reactions)



مقدمه

بیماری عفونی توبرکلوز (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 توبرکلوزیس کمپلکس (Mycobacterium tuberculosis complex) نامیده می شوند. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (M. Tuberculosis)، مایکوباکتریوم بویوس (M. bovis) و مایکوباکتریوم بویوس ب ث (M. bovis BCG) از جمله این باکتری ها میباشند.

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

محتویات کیت

جدول ۱) محتویات کیت

Color	Title	Volume per vial	24 Rxns	48 Rxns	96 Rxns
Blue	PCR Buffer Mix ¹	260 µl	1	2	4
Purple	Primers & Probes ²	135 µl	1	2	4
Red	Positive Control ³	100 µl	1	1	1
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 مایکوپلازما توبرکلوزیس و کنترل داخلی، ۳- کنترل مثبت کیت، 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 کیتی که تاریخ انقضای آن گذشته است استفاده نکنید.
- از مخلوط کردن محلولها و موادی که شماره سریال (Lot Number) متفاوت دارند خودداری نمایید.
- 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 µL و 10-100 µL)
- سر سمپلر فیلتردار DNase-RNase Free
- میکروتیوب DNase-RNase Free، 1.5 ml
- میکروتیوب های مخصوص PCR
- دستگاه مینی اسپین ورتکس
- کیت استخراج DNA باکتریایی
- 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 پروب اختصاصی ژن کنترل داخلی (IC) با رنگ JOE (کانال زرد) نشان دار شده است.

استفاده از پروب های متصل شده به رنگ های متفاوت، امکان تشخیص همزمان DNA اختصاصی MTB و کنترل داخلی را به دستگاه Real-Time PCR می دهد.

استفاده از پروب 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

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.

نمونه و شرایط نگهداری آن

- نمونه مناسب جهت انجام آزمون MTB، Tissue، Whole Blood، Urine، Plevral fluid، Sputum، 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 می شود قبل از فریز کردن، نمونه ی بیمار را در دو حجم 200 µL جهت انجام تست و احتیاطاً 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 ها 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 نمی شود.
- رعایت اقدامات ایمنی عمومی در هنگام کار با نمونه های عفونی، محلول ها و ریجنتها الزامیست.
- قبل از انجام آزمون سطوح کاری را به وسیله ی وایتکس ۱۰٪ و سپس الکل ۷۰٪ ضدعفونی نمایید.
- سپس به مدت حداقل ۲۰ دقیقه لامپ UV هود و یا Workstation را روشن نموده تا فضای زیر آن ضد عفونی گردد.
- 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.
- 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.
- 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 نمونه کنترل داخلی را مستقیماً به خون 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

تهیه مستر میکس

بر اساس تعداد واکنش هایی که میخواهید انجام دهید ویال های کیت شامل PCR Buffer Mix، Positive Control، Primers & Probes، Internal 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 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 ۲ 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	17 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 پلازما اضافه شده باشد (قبلا در قسمت استخراج ژنوم توضیح داده شد). در این صورت مستر میکس را بر اساس جدول 3 تهیه نمایید.

یادداشت:

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 پیتینگ و یا ورتکس آرام، هموژن و سپس اسپین نمایید.
- مقدار 15 µL از مستر میکس تهیه شده را به میکرو تیوب های مخصوص PCR 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 و NTC را در میکرو تیوب های مربوطه اضافه نموده و حداقل ۲ بار و به آرامی پیتینگ نمایید.
- نکته: برای جلوگیری از آلودگی حین کار به ترتیب لوله NTC، نمونه های بیماران و سپس لوله ی کنترل مثبت را آماده نمایید.
- سپس بلوک آلومینیومی سرد (Ice Rack) را به اتفاقی که دستگاه Real-Time PCR قرار دارد منتقل کنید.

تنظیم برنامه دستگاه

- رنگ فلورسنت جهت گزارشگر (Reporter) FAM، MTB و رنگ فلورسنت جهت گزارشگر (Reporter) کنترل داخلی، JOE، است.
- نکته: بهتر است برنامه دمایی قبل از آماده کردن مستر میکس و اضافه کردن الگو، تنظیم گردد.

برنامه دمایی برای آزمون Real-Time PCR

جدول ۴ برنامه ی 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

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 میبایست تکرار شود.

توجه: دقت نمایید که شرط دارا بودن شکل سیگموئیدی برای تفسیر نتایج نمودار ضروری است. در دستگاه Rotor Gene Q می توانید جهت اصلاح شیب نمودار ها و مشاهده ی نمودارهای سیگموئیدی، گزینه ی Slope correction را روشن و یا خاموش نمایید.

جدول ۶ تفسیر نتایج یک آزمون

Detection Channel	Result Interpretation	
FAM	JOE	-----
Positive	Positive or Negative	Result is Positive
Negative	Positive	Target (MTB Complex) Not Detected Result 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.

* برای دسترسی به دفترچه ی راهنما کد QR را اسکن نمایید.

این کیت براساس قوانین و مقررات گواهی نامه ایزو 13458 تولید شده است.



آدرس: تهران، خیابان شریعتی، خیابان کدویی، کوچه ی طباطبایی، پلاک ۲
ایمیل پشتیبانی: support@famta.co
تلفن پشتیبانی: ۰۹۰۴ ۴۳۷ ۹۰۰۰