

کیت BehDx TB Real Time PCR به منظور شناسایی حضور ژنوم باکتری TB با استفاده از روش TaqMan-Real Time PCR در نمونه های بیولوژیک انسانی طراحی و عرضه شده است.

4. حیطه کاربری

کیت BehDx TB Real Time PCR یک کیت آزمایشگاهی با کاربرد تحقیقاتی برای شناسایی کیفی DNA اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در نمونه های بیولوژیک انسانی با استفاده از روش Real-Time PCR و همچنین استفاده از فناوری TaqMan طراحی شده است.

5. نکات مهم : لطفا قبل از استفاده مطالعه شود.

- قبل از شروع فرآیند تمامی ریجنت ها بایستی در دمای محیط قرار گیرند تا ذوب شوند.
- زمان ذوب شدن ریجنت ها بیش از 30 دقیقه نباشد تا از تخریب مواد جلوگیری شود.
- پس از ذوب ریجنت ها، همگن و میکروفیوژ شوند.
- کلیه مراحل بایستی بر روی بلوک سرد انجام گیرد.
- از میکروتیوب های DNase & RNase free و تیپ های فیلتردار DNase & RNase free استفاده شود.

6. تجهیزات و مواد لازم که در کیت فراهم نشده است

- دستگاه های Real-Time PCR سازگار (به بخش 8 دستگاه های سازگار مراجعه شود)
- کیت ها و یا دستگاه های استخراج DNA باکتریایی مناسب (به بخش 10-11 استخراج DNA مراجعه شود)
- دستگاه سانتریفیوژ و میکرواسپین
- میکروتیوب PCR و تیپ های فیلتر دار DNase & RNase free
- دستکش بدون پودر یک بار مصرف

7. نمونه های قابل استفاده

DNA باکتریایی استخراج شده از:

- خلط (Sputum)
- نمونه BAL
- کشت های باکتریایی

8. دستگاه های سازگار

کیت برای استفاده در دستگاه های PCR زیر توسعه و اعتبارسنجی شد.

- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- Mic qPCR cycler (Bio Molecular Systems)

1. محتویات کیت

CAT.NO	محتویات	TB (24RXN)	TB (48RXN)	TB (96RXN)	رنگ درب تیوب
BD139	TB Mix 1	1x240 µl	2x240 µl	4x240 µl	آبی
BD140	TB Mix 2	1x120 µl	2x120 µl	4x120 µl	قهوه ای
BD141	TB Internal Control	1x200 µl	1x400 µl	2x400 µl	سفید
BD142	TB Positive Control	1x80 µl	1x160 µl	2x160 µl	قرمز
BD143	TB Negative Control	1x80 µl	1x160 µl	1x320 µl	سبز

2. شرایط پایداری و نگهداری

- حمل کیت بایستی در شرایط دمای -20°C و در حداقل زمان ممکن صورت گیرد.
- پس از دریافت کیت، محتویات بایستی مطابق شرایط درج شده بر روی جعبه کیت نگه داری شوند.
- در صورت نگه داری کیت در دمای نامناسب در حین حمل از آن استفاده نشود.
- در صورت سالم نبودن بسته بندی کیت و یا عدم تطابق شکل ظاهری مواد مصرفی با توضیحات از آن استفاده نشود.
- کیت را در دمای ثابت نگه داری نموده و از نور خورشید محافظت کنید.
- از تکرار متعدد چرخه انجماد / ذوب پرهیزید.
- در صورت باز نشدن مواد مصرفی و نگه داری در دمای توصیه شده این محصول تا پایان تاریخ انقضای مندرج بر روی جعبه کیت پایدار خواهد ماند.

3. معرفی

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (Mycobacterium tuberculosis) یک گونه باکتریایی بیماری زا از جنس مایکوباکتریوم و عامل ایجاد کننده سل (Tuberculosis) است. سل یک بیماری مزمن است که عمدتاً ریه و غدد لنفاوی مرتبط را تحت تأثیر قرار می دهد. با این حال، باکتری M. tuberculosis می تواند سایر اندام ها را نیز درگیر کند. سل عمدتاً از طریق آئروسول ها از فردی به فرد دیگر منتقل می شود. سل (TB) یک بیماری چالش برانگیز در کشورهای صنعتی و در حال توسعه است.

10-2. کنترل داخلی

کیت BehDx TB Real Time PCR شامل یک ویال کنترل داخلی (IC) است که به منظور کنترل احتمال وجود مهارکننده های PCR و نظارت بر روش جداسازی DNA مورد استفاده قرار می گیرد.

اگر می خواهید از کنترل داخلی منحصراً برای بررسی مهار PCR استفاده کنید، باید مستقیماً به Master Mix اضافه شود. در صورتی که از کنترل داخلی برای نظارت بر روش جداسازی DNA و بررسی احتمال مهار PCR استفاده شود، بایستی در مرحله استخراج، کنترل داخلی را به میزان 10 درصد از حجم بافر الون در مرحله لایز اضافه کنید، به عنوان مثال اگر حجم مورد استفاده بافر الون در مرحله استخراج 60 µl باشد، به مقدار 6 µl از IC برای هر نمونه به میکس بافر لایز کننده و نمونه اضافه شود.

توجه: کنترل داخلی را مستقیماً به نمونه اضافه نکنید. کنترل داخلی باید فقط به مخلوط بافر لایز کننده و نمونه یا مستقیماً به بافر لایز کننده اضافه شود.

10-3. آماده سازی مسترمیکس

1. برای تهیه مسترمیکس، 10 µl از TB Mix 1 و 5 µl از TB Mix 2 برای هر نمونه به لوله اصلی واکنش اضافه نمایید.

در صورتی که کنترل داخلی در مرحله استخراج اضافه شده باشد، لطفاً مطابق برنامه حجمی مندرج در جدول زیر تیوب ها را آماده کنید.

Number of reactions	1	15
TB Mix 1	10 µl	150 µl
TB Mix 2	5 µl	75 µl
Total	15 µl	225 µl

در صورتی که کنترل داخلی در مرحله PCR اضافه شود، بایستی مطابق جدول زیر کنترل داخلی مستقیماً به Master Mix اضافه شود.

Number of reactions	1	15
TB Mix 1	10 µl	150 µl
TB Mix 2	5 µl	75 µl
TB Internal Control	1 µl	15 µl
Total	16 µl	240 µl

2. میکروتیوب را ابتدا ورتکس و سپس برای مدت کوتاهی میکروپیوژر نمایید.

10-4. آماده سازی واکنش PCR

1. 15 µl از مسترمیکس تهیه شده در مرحله قبل را به تیوب های PCR اضافه گردد.

- Tianlong Real-Time PCR systems (Xi'an Tianlong Science and Technology)
 - QuantStudio™ 5 Pro Real-Time PCR System
 - CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
 - CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
 - LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- توجه:** این کیت برای استفاده در دستگاه های بدون نیاز به ROX طراحی گردیده است.

9. نکات ایمنی

- از جا به جایی و یا ترکیب ریجنت های کیت با lot number مختلف جدا خودداری کنید.
- برای جلوگیری از انتقال آلودگی به محلول مسترمیکس، بلافاصله پس از دریافت کیت، تیوب های کنترل مثبت، منفی و تیوب کنترل داخلی را در فریزر مجزا از تیوب حاوی مسترمیکس قرار دهید.
- از کیت و یا اجزای کیت بعد از گذشت تاریخ انقضا استفاده نشود.
- این محصول توسط افراد متخصص و آموزش دیده در زمینه تست های مولکولی قابل استفاده می باشد، هنگام کار از گان آزمایشگاهی و دستکش یکبار مصرف استفاده کنید.
- در هنگام استفاده از ریجنت های کیت توصیه می شود از دستکش های بدون پودر استفاده شود.
- تمامی نمونه ها می توانند باعث انتقال آلودگی شوند و بایستی در حمل و استفاده از آن ها دقت شود. از تماس مستقیم با نمونه ها خودداری شود. لوازم و موادی که با نمونه ها در ارتباط بوده بایستی به درستی ضدعفونی و اتوکلاو شوند.
- از تماس نمونه یا ریجنت ها با پوست، چشم و غشاهای مخاطی خودداری کنید. در صورت تماس با پوست، چشم یا غشاهای مخاطی، فوراً با آب بشویید و سریعاً به پزشک مراجعه کنید.
- تمامی محتویات کیت پس از استفاده جزء دسته ی زباله های زیستی خطرناک می باشد و باید به درستی دفع شود.

10. فرآیند (دستورالعمل استفاده)

10-1. استخراج DNA

برای جداسازی DNA استفاده از کیت های زیر توصیه می شود:

1. BehPrep G-Plus DNA Extraction Kit (Cat Number: BP101)
 2. BehPrep Bacterial DNA Extraction Kit (Cat Number: BP121)
- استخراج DNA توسط کیت و دستگاه های استخراج با کیفیت و خلوص کافی نیز مورد تایید است.

کانال		تفسیر
FAM	HEX	
+	+/-	• باکتری TB شناسایی شده است. • در صورتی که در کانال HEX منحنی برای نمونه مشاهده نشود ولی در کانال FAM منحنی مشاهده شود نمونه مثبت در نظر گرفته می شود.
-	+	• باکتری TB شناسایی نشده است. • نمونه شامل مقدار قابل شناسایی از DNA باکتریایی نمی باشد.
-	-	• وجود مهارکننده در واکنش PCR • انجام ناصحیح مراحل فرآیند تست و آماده سازی واکنش، تست از مرحله استخراج یا PCR تکرار شود.

2. به هر تیوب تست 10 µl از DNA استخراج شده بیمار یا 10 µl از کنترل ها (کنترل مثبت یا منفی) اضافه گردد.
3. میکس نمونه و مسترمیکس ، و همچنین کنترل و مسترمیکس کاملاً همگن و میکروفیوژ گردد.
- پیشنهاد می شود تمام این مراحل بر روی یخ یا بلوک سرد انجام شود.

Reaction setup	
Master Mix	15 µl
Sample or Control	10 µl
Total	25 µl

5-10. برنامه دمایی

تیوب ها را در دستگاه قرار داده و مطابق برنامه زیر تست را انجام دهید.

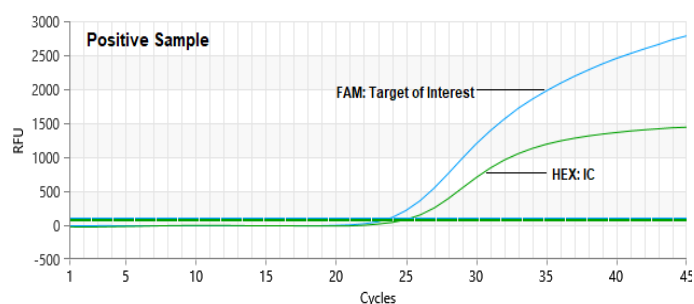


Figure1. -Positive Sample

program	Temperature [°C]	Hold [hh:mm:ss]	Cycles	Analysis Mode
Activation	95	00:03:00	1	None
Amplification	95	00:00:10	45	Quantification
	61*	00:00:30		

* خوانش در دمای 61 °C انجام می گیرد و کانال های FAM و HEX بایستی روشن شوند .

سیگنال FAM (سبز) نشان دهنده وضعیت ژن TB و سیگنال HEX (زرد) نشان دهنده وضعیت ژن کنترل داخلی می باشد.

11. تفسیر نتایج

1. نمودارهای مثبت بایستی به صورت کاملاً سیگموئیدی باشند و نمودارهایی که شکل سیگموئیدی ندارند می بایستی به عنوان منفی در نظر گرفته شوند .
 2. خط آستانه (threshold) بر اساس نمونه مثبت و یا کنترل مثبت تعیین شود.
- نتایج به دست آمده بر اساس جدول زیر تفسیر شود.

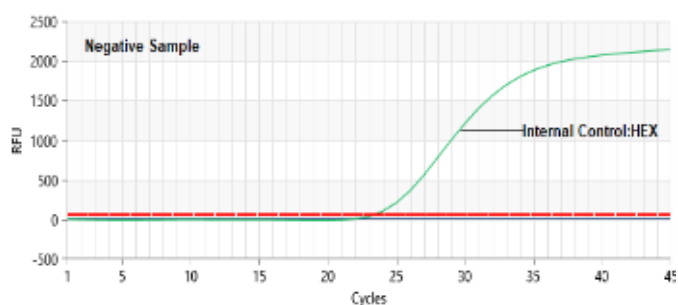


Figure2-Negative Sample

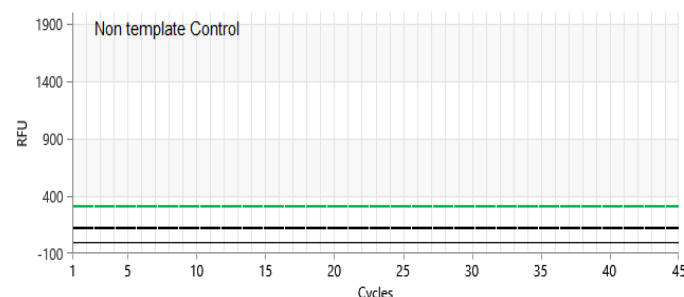


Figure3.Non-Template Control

12. حساسیت و اختصاصیت :

حساسیت تحلیلی با تجزیه و تحلیل سری رقت پلاسمید TB تعیین شده است. برای تشخیص DNA اختصاصی باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساسیت تحلیلی برابر با $10 \text{ copies}/\mu\text{l}$ می باشد.

اختصاصیت تحلیلی کیت حاضر با توجه به میکروارگانیسم های موجود در نمونه های بالینی به جز مایکوباکتریوم توبرکلوزیس واکنشی مشاهده نشده است.

نماد	مفهوم	نماد	مفهوم
	کاربرد تحقیقاتی		محدودیت دمای
	اطلاعات کارخانه		تعداد تست
	تاریخ تولید		تاریخ انقضا
	از تابش نور دور نگه داشته شود		مخاطرات زیستی
	احتیاط		حاوی دستور العمل استفاده از محصول
	شماره سری ساخت		کد کالا