راهنمای کیت

Leishmania RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۱

جهت تشخیص DNA تک یاخته Leishmania

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

24 (Cat# LeishRQ24)

48 (Cat# LeishRQ48)

96 (Cat# LeishRQ96)

NG-WI-ASL-54-101

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه..... ۳

۲. حیطه کاربرد..... ۳

۳. اطلاعات زمینه ای..... ۳

۴. اساس آزمایش..... ۴

۵. محتویات کیت..... ۴

۶. مدل های بسته بندی..... ۵

۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت..... ۵

۸. محدودیت کاربرد..... ۵

۹. سایر موارد مورد نیاز..... ۶

۱۰. احتیاط و نکات لازم..... ۶

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۷

۱۲. عوامل مزاحم..... ۷

۱۳. کنترل داخلی..... ۸

۱۴. استخراج DNA..... ۹

۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش..... ۹

۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها..... ۱۰

۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۱۰

۱۸. تنظیم دستگاه StepOne..... ۱۲

۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۱۲

۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene..... ۱۳

۲۱. آنالیز نتایج StepOne..... ۱۵

۲۲. میزان حساسیت..... ۱۷
۲۳. روش امحاء..... ۱۷
۲۴. پشتیبانی فنی..... ۱۸
۲۵. اطلاعات تماس..... ۱۸
۲۶. منابع..... ۱۸
۲۷. توضیحات برچسب..... ۱۹

۱. مقدمه

کیت Leishmania RQ جهت تشخیص DNA تک‌یاخته آغازی Leishmania به روش Real-time PCR طراحی شده است. در این روش، DNA به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری ثانویه ای 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 Leishmania امکان بررسی نمونه بیمار را جهت تشخیص DNA Leishmania با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

لیشمانیا (Leishmania) یک تک یاخته آغازی است که عامل بیماری انگلی لیشمانیاز (Leishmaniasis) در مهره داران به ویژه انسان، جوندگان و سگ سانان می‌باشد. ژنوم لیشمانیا متشکل از DNA بوده و تا کنون بیش از ۳۰ گونه لیشمانیا شناخته شده است. تعدادی از این گونه‌ها شامل L. major, L. tropica, L. donovani, L.aethiopica, و L. infantum به لحاظ پزشکی دارای اهمیت بیشتری هستند. عامل اصلی انتقال لیشمانیا به انسان حشره‌ای به نام پشه خاکی (Phlebotomine sand flies) است. این بیماری در بخش‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری مانند مناطق جنوبی ایران شیوع بیشتری دارد و بر اساس گزارش‌های سالانه حدود ۲۵ هزار مورد ابتلا جدید در ایران ثبت می‌شود. لیشمانیاز بدون

علامت یا با علائم بالینی مختلف ظاهر می‌شود. براساس علائم، این بیماری انگلی به سه دسته لیشمانیاز جلدی (سالک)، احشایی و مخاطی‌جلدی تقسیم می‌شود. لیشمانیاز جلدی شایع ترین نوع عفونت با این انگل است. به علت تشابه علائم بیماری لیشمانیاز احشایی با برخی از بیماری های شایع مانند سل، حصبه و مالاریا، تشخیص سریع و اختصاصی این انگل جهت درمان بیماری اهمیت بسیاری دارد.

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی عامل عفونی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction/PCR 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 برطرف می‌گردد.

۵. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک فلش کارت و مواد زیر می‌باشد:

برچسب	محتوا	حجم
Leish Mix	میکس آماده برای PCR*	۳۶۰ میکرولیتر
Pos Ctrl	شاهد مثبت	۱۵۰ میکرولیتر
Internal Ctrl	کنترل داخلی*	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

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

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست وچهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می‌باشد.

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 می‌باشند.

از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید، زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می‌شود.

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 می‌گردد.
- 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 نمی‌باشد.

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
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و 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.
- 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 افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می‌باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. 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 لوله های درون کیت، آنها را کاملا ذوب نموده و با چند تکان ملایم، از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آنها 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. در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر روی یخ خرد شده خودداری کنید.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش لیشمانیا، نمونه‌های بافتی مانند؛ زخم‌های پوستی (برای لیشمانیاز پوستی)، نواحی مخاطی دارای ناهنجاری (برای لیشمانیاز مخاطی جلدی) و آسپیراسیون مغز استخوان، غدد لنفاوی و خون کامل یا بافی کوت (برای لیشمانیاز احشایی) می‌باشد. نمونه در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد برای ۴۸ ساعت قابل نگهداری است و برای مدت طولانی تر باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر یا پائین تر نگهداری شود. در چنین شرایطی نمونه تا چندین روز پایدار می‌ماند.

۱۲. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می‌شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی‌باشد.

مقادیر بالای بیلی‌روبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش

مزاحمتی ایجاد نمی‌کند.

۱۳.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 می‌توانید در مرحله استخراج استفاده نموده یا آن را صرفاً در مرحله PCR به Leish Mix اضافه نمایید. در حالت اول، کنترل داخلی علاوه بر بررسی مهار واکنش، نشانگر کیفیت استخراج نیز می‌باشد. برای استفاده در مرحله استخراج، 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 کارآیی خود را از دست خواهد داد.

در صورتی که کنترل داخلی را به Leish Mix اضافه می‌نمایید، تنها می‌توانید مهار واکنش PCR را بررسی کنید. به این منظور به ازای هر واکنش PCR، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را به Leish Mix اضافه نمایید. به طور مثال برای ۱۰ واکنش به ۱۵۰ میکرولیتر از میکس، ۱۰ میکرولیتر کنترل داخلی اضافه کنید و مخلوط حاصل را مطابق توضیحات بخش ۱۵ استفاده نمایید.

در صورت موفق بودن واکنش، کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۲ در دستگاه RotorGene و ۲۸ تا ۳۴ در دستگاه StepOne می‌شود.

۱۴. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. استفاده از کیت‌های زیر توصیه می‌شود:

- QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Cat. no. 51404, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- Roche; High Pure FFPET DNA Isolation Kit (Cat. No. 06 650 767 001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، یک لوله برای کنترل مثبت و یک لوله برای کنترل منفی نیز در نظر بگیرید.

در صورتی که کنترل داخلی را در حین استخراج وارد کرده اید، به هر لوله مستقیماً ۱۵ میکرولیتر از Leish Mix اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به Leish Mix اضافه نمایید، مطابق توضیحات بخش ۱۳، کنترل داخلی را به میکس افزوده و ۱۵ میکرولیتر از مخلوط حاصل را به هر لوله منتقل کنید.

در پایان ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده، شاهد یا آب به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه StepOne لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت Leishmania RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

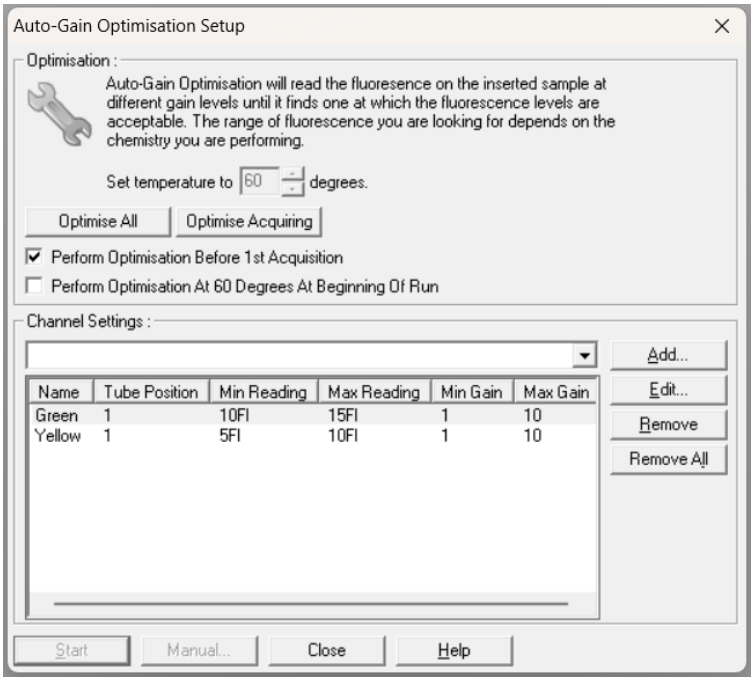
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

فایل تمپلیت Leishmania را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل Leishmania 0.1 یا Leishmania 0.2 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی 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 دقیقا مطابق تصویر صفحه بعد برای هر دو کانال انجام دهید. Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس Leishmania باشد). گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.



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. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای کنترل مثبت Positive Control را انتخاب کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۸. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل فلش کارت همراه کیت را انتخاب کنید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت).
از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. شاهدهای مثبت و منفی به همراه چند نمونه از پیش تعریف شده اند. آنها را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می‌توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می‌توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه‌های Real-Time PCR استفاده می‌کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

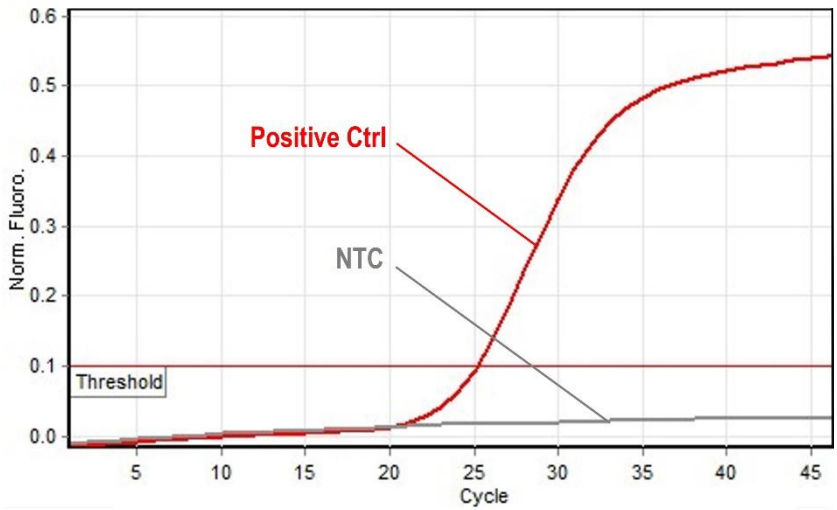
Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ‌های FAM و VIC تنظیم شود. Leish Mix موجود در کیت حاوی ROX می‌باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

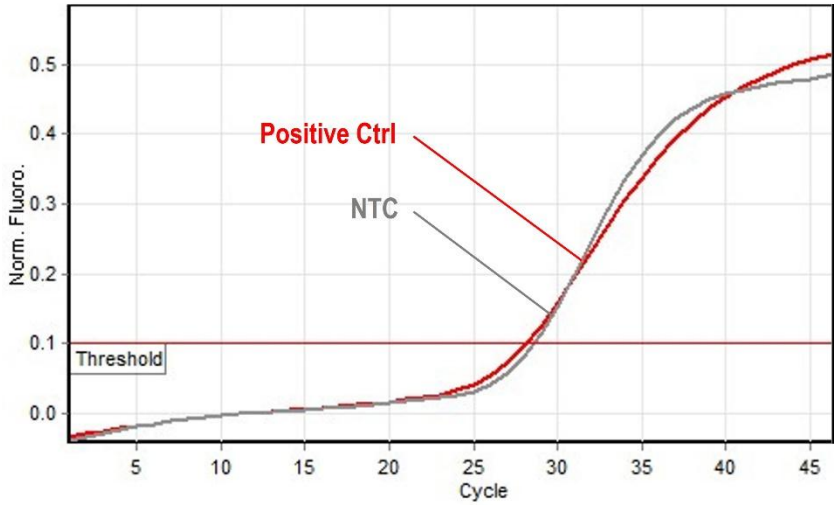
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold حداقل را روی ۰/۰۲ یا بالاتر از فلورسانس زمینه قرار داده و دکمه OK را بزنید تا پس از رسم منحنی استاندارد نتایج در جدول پایین صفحه نشان داده شوند. همچنین می توانید به طور ساده آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. فرایند فوق را برای کانال Yellow نیز تکرار کنید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدهای مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر ۱، ۲ را ملاحظه فرمایید. توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **Leishmania** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی** می‌باشد.

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



شکل ۱. منحنی شاهدها در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل۲. منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

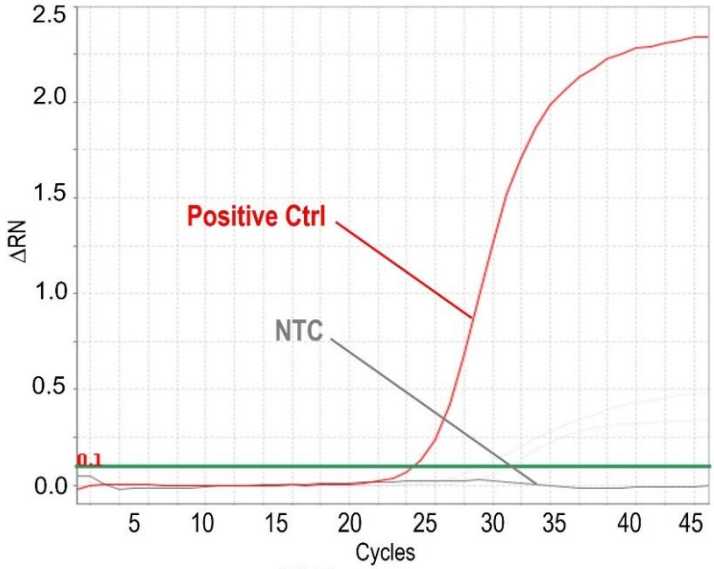
- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** مثبت با CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال **زرد** می‌توان آن را **مثبت** گزارش کرد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال **سبز** منفی باشد ولی در کانال **زرد** مثبت و دارای منحنی سیگموییدو CT بین ۲۷ تا ۳۲ باشد، نمونه از نظر لیشمانیا **منفی** است.
- در صورتی که نمونه در هر دو کانال **سبز** و **زرد** منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۲۱. آنالیز نتایج StepOne

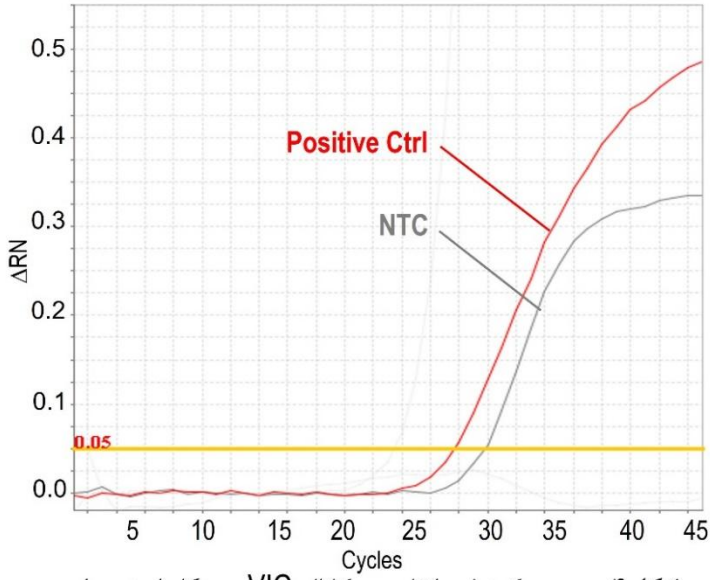
برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای VIC آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار کنترل منفی و کنترل داخلی، تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش **تابش FAM** مربوط به **Leishmania** و افزایش **تابش VIC** حاصل از **کنترل داخلی** می‌باشد.

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



شکل۳. منحنی شاهدها در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل۴. منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه استپ وان

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال **FAM** مثبت با CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال **VIC** می‌توان آن را **مثبت** گزارش کرد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال **FAM** منفی باشد ولی در کانال **VIC** مثبت و دارای منحنی سیگموییدبا CT بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه از نظر لیشمانیا **منفی** است.
- در صورتی که نمونه در هر دو کانال **FAM** و **VIC** منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش را می‌توانید در جدول زیر مشاهده نمایید.

Green	Yellow	Result
+	+/-	Positive
-	+	Negative
-	-	Inconclusive

۲۲. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم لیشمانیا بررسی شده است و معادل ۴ کپی در میکرولیتر می‌باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر لیشمانیا در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتر نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

۲۳. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیما

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.

۲۴. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا ادرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۵. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.com

۲۶. منابع

- Bates, P.A., 2007. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International journal for parasitology, 37(10), pp.1097-1106.
- Farrell, J.P., 2002 Leishmania. New York, NY: Springer US.

- Feiz Haddad, M.H. et al., 2021 'Epidemiological study of leishmaniasis in Iran and the Middle East in the last two decades', Jundishapur Journal of Medical Sciences, 20(2), pp. 86–100.
- Mackay IM., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect.; 10 (3): 190 – 212.
- Mann, S., Frasca, K., Scherrer, S., Henao-Martínez, A.F., Newman, S., Ramanan, P. and Suarez, J.A., 2021. A review of leishmaniasis: current knowledge and future directions. Current tropical medicine reports, 8, pp.121-132.

۲۷. توضیحات برچسب

RUO	جهت مصارف پژوهشی		تولید کننده		دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید
LOT	کدبهر (شماره بچ)	Σ	تعداد <n> آزمون کافی		تاریخ انقضاء
REF	شماره کاتالوگ	SN	شماره سریال	-10°C -30°C	محدوده دمایی

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.ir مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

Leishmania RQ
Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.1

For Real-Time PCR Detection of Leishmania DNA
For Research Use Only

24 (Cat# LeishRQ24)
48 (Cat# LeishRQ48)
96 (Cat# LeishRQ96)
NG-WI-ASL-54-101

RUO

NovinGene ParsVira
No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Novin Gene

Table of Contents

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

20. Data Analysis: Rotor-Gene 10
21. Data Analysis: StepOne 13
22. Sensitivity 15
23. Disposal Method 15
24. Technical Support 15
25. Contact Information 15
26. References 16
27. Symbols 16

1. Introduction

Leishmania RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting Leishmania DNA. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. This Mix 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

Leishmania RQ kit is intended for detecting Leishmania DNA. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene, StepOne and MIC machines.

3. Background Information

Leishmania is a parasitic protozoan that causes Leishmaniasis in vertebrates. Over 30 species of Leishmania have been known but some of them are more important as they can infect humans, such as; L. major, L. tropica, L. aethiopica, L. donovani and L. infantum. Phlebotomine sand flies are the intermediate host for Leishmania. Leishmaniasis is most prevalent in tropical and subtropical regions. Based on clinical symptoms, the three main phenotypic categories of disease are Cutaneous Leishmaniasis (CL), Visceral Leishmaniasis (VL), and Mucocutaneous Leishmaniasis (MCL). The infection could be asymptomatic or present with various clinical manifestations. Cutaneous Leishmaniasis is the most prevalent type of infection with Leishmaniasis. Since the symptoms of

Visceral Leishmaniasis are like some common diseases such as tuberculosis, typhoid, and malaria, rapid and specific diagnosis of this parasite is crucial for effective treatment.

4. Test Principle

The pathogen is 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. Therefore, 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, a flash card and the following reagents:

Label	Content	Quantity
Leish Mix	PCR mix*	360 µl
Pos Ctrl	Positive Control	150 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.

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°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 computer accessory
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease-free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease-free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

10. General Precautions

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

- Treat all samples as potentially infectious.

- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the PCR mix is aliquoted into tubes, and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on crushed ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice while working.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Proper sample to test for leishmania is a sample obtained from tissue samples such as skin lesions (for Cutaneous Leishmaniasis), or biopsy specimens from mucosal areas with abnormalities (for Mucocutaneous Leishmaniasis) or from bone marrow, whole blood (for Visceral Leishmaniasis). Sample can be stored at 2-8°C for a 48 hours or at -20°C or lower for up to a few days.

12. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes and samples of heparinized patients must not be used.

Elevated levels of bilirubin (≤4.5 mg/dl) and lipids (≤1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

13. Internal Control (IC)

To assess the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition, and to prevent false negative results, the Leishmania RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the Leishmania Mix. To monitor both DNA extraction and PCR reaction, the 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 the IC should not be added directly to the patient sample (i.e, before the addition of lysis buffer) as it loses its efficiency.

If the IC is added to Leishmania Mix, only PCR inhibition can be monitored. For this purpose, 1ul of the IC should be added to each reaction. For example, for 10 PCR reactions, 10ul of the IC should be added to 150ul of the PCR Mix before it is added to the tubes. In a successful DNA extraction and PCR test, the IC should generate a CT of 28-32 in the Yellow channel on the RotorGene and a CT of 28-34 in the VIC channel on the StepOne.

14. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend using either of:

- QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Cat. no. 51404, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- Roche; High Pure FFPET DNA Isolation Kit (Cat. No. 06 650 767 001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

15. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. Place the required number of tubes on a cold block. Consider one tube for each sample, four for standards and one for the negative control.

If the IC is introduced during the extraction process, pipette 15µl of Leish Mix to each PCR tube.

If the IC is added to the Leish Mix, add 15ul of the prepared mix (as described in section 13) to each PCR tube.

Then add 10ul of isolated DNA, Control, or water to each tube.

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

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

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

16. Devices and software

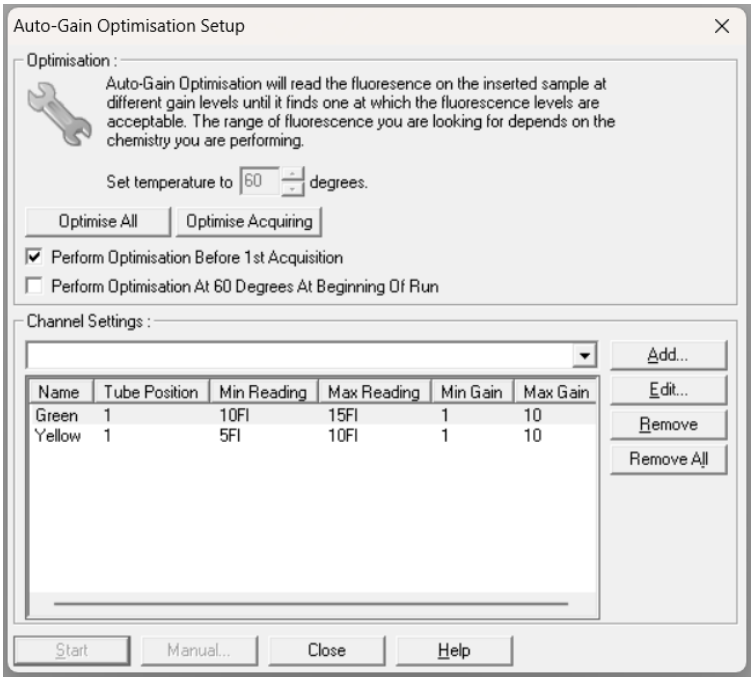
Leishmania RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

17. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the Leishmania template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); Leishmania 0.1 is for strip tubes and Leishmania 0.2 is for 0.2ml tubes. Program starts.

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the below image. Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain Leishmania Mix).



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

18. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set-Up menu, click Template (provided in the flash card, or accessible by kit QR code).

Click on Plate Setup. One Positive control and one negative control, and a few samples are defined. You may change plate setup using right-click options (copy, paste, clear). You may also add /remove samples or change the sample name on the “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment to the desired location. The instrument will start shortly.

19. 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	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. The Leish Mix contains ROX with the final concentration of 300nM in reaction.

20. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure that in the sample menu, Patient samples are defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.

Analyze the data according to the Rotor-Gene manual.

The signal in the **Green** channels is due to **Leishmania** and a signal in the **Yellow** channels is due to **IC**.

Briefly, click on the Analysis menu and then under the Quantitation tab double-click on Cycling A. Green. In the pop-up for Automatic

Threshold increase the minimum or lower bound until it surpasses the negative control or the NTC fluorescence, and then click on OK or simply set the threshold on 0.1 for the Green channel.
Repeat the above for Cycling A. Yellow and manually put threshold on 0.1. Figures 1 and 2 represent typical graphs for the Rotor-Gene machine.

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:

- A sample is **Positive** if it is positive in the Green channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40.
- A sample is **Negative** if it is negative in the Green channel 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 both the Green and Yellow channels.

The Interpretation of results is summarized in the table on page 15.

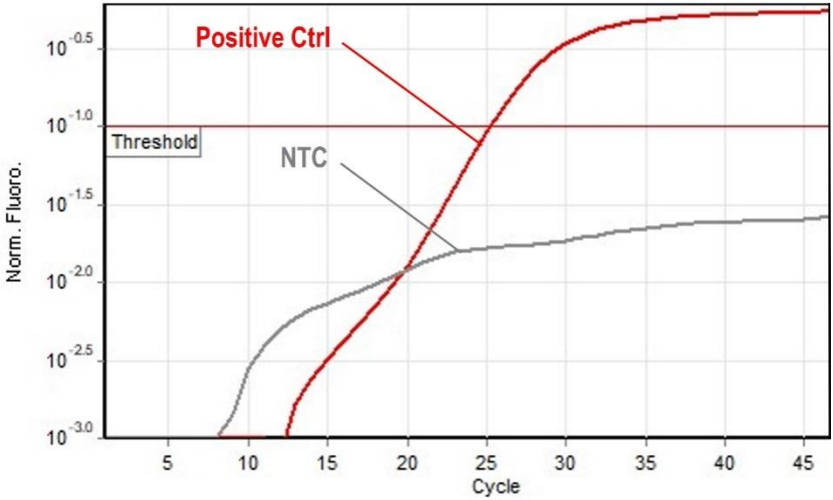


Fig 1. Typical Controls graph in Green channel for Rotor-Gene

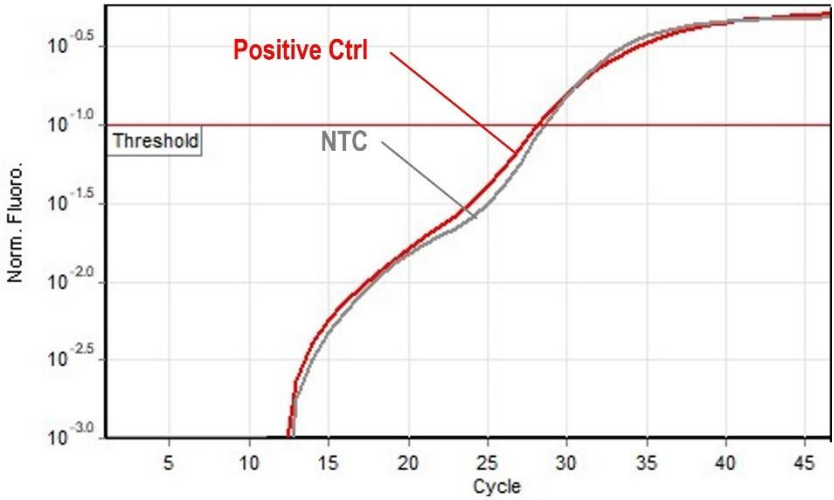


Fig 2. Typical IC graph in Yellow channel for Rotor-Gene

21. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to StepOne manual. Briefly, click on Analyze and set the threshold for the **Leishmania/FAM** at 0.1 and at 0.05 for the **IC/VIC**. Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

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.

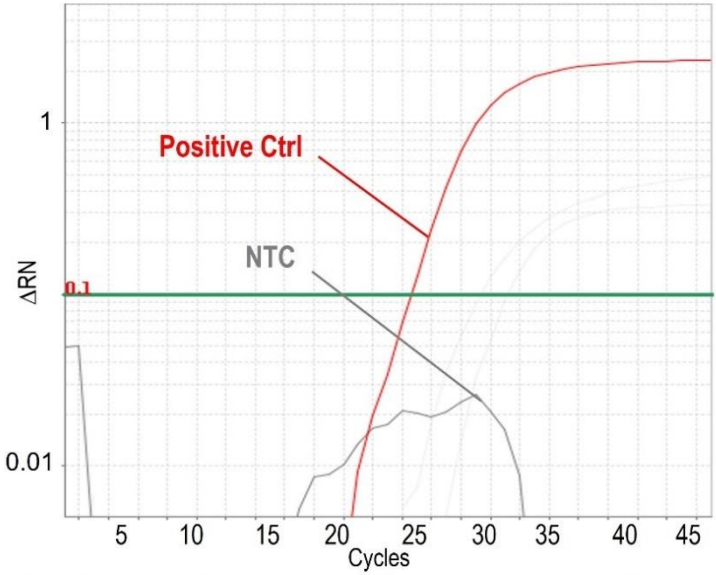


Fig 3. Typical Controls graph in FAM channel for StepOne

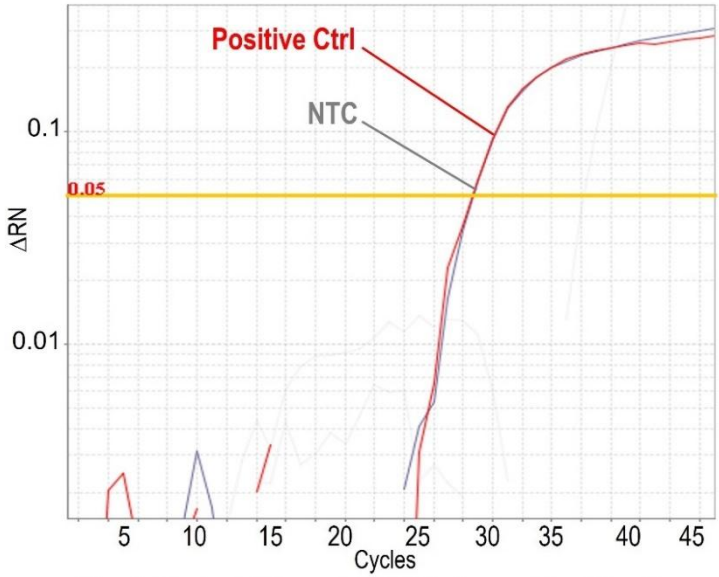


Fig 4. Typical IC graph in VIC channel for StepOne

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the FAM/Leishmania channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40.
- A sample is **Negative** if it is negative in the FAM/Leishmania channel while it is positive in the VIC/IC channel with a sigmoid graph and CT of 28-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both the FAM/Leishmania and VIC/IC channels.

The Interpretation of results is summarized in the following table.

Green	Yellow	Result
+	+/-	Positive
-	+	Negative
-	-	Inconclusive

22. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with a cloned target, and showed a limit of detection equal to 4 copies/µl.

23. 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.

24. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone: +98 993-6223241
Email: info@novingene.com

25. Contact Information

NovinGene ParsVira
Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.
Tel: +98 21-88837393
+98 990-1813124
Email: info@novingene.com
Website: www.novingene.com

26. References

- Bates, P.A., 2007. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International journal for parasitology, 37(10), pp.1097-1106.
- Farrell, J.P., 2002 Leishmania. New York, NY: Springer US.
- Feiz Haddad, M.H. et al., 2021 'Epidemiological study of leishmaniasis in Iran and the Middle East in the last two decades', Jundishapur Journal of Medical Sciences, 20(2), pp. 86–100.
- Mackay IM., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect.; 10 (3): 190 – 212.
- Mann, S., Frasca, K., Scherrer, S., Henao-Martínez, A.F., Newman, S., Ramanan, P. and Suarez, J.A., 2021. A review of leishmaniasis: current knowledge and future directions. Current tropical medicine reports, 8, pp.121-132.

27. Symbols

RUO	Research use only		Manufacturer		Consult instructions for use
LOT	Lot number	Σ	Content sufficient for <n> tests		Use-by date
REF	Catalogue number	SN	Serial number	-30°C -10°C	Temperature limit

For more information and resources please visit our website; www.novingene.com