راهنمای کیت TB RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۳/۵

جهت تشخیص و کمیت سنجی DNA گروه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس
به روش Real-Time PCR
مخصوص تحقیقات

24 (Cat# TBRQ24)
48 (Cat# TBRQ48)
96 (Cat# TBRQ96)
NG-WI-ASL-10-305

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 نگه داری و انتقال آن..... ۷
۱۲. کنترل داخلی..... ۸
۱۳. استخراج DNA..... ۹
۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش..... ۹
۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها..... ۱۰
۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه StepOne..... ۱۲
۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۱۲
۱۹. آنالیز نتایج Rotor-Gene..... ۱۳

۲۰. آنالیز نتایج StepOne ۱۵
۲۱. محاسبه تیتر..... ۱۷
۲۲. محدوده خطی..... ۱۸
۲۳. میزان حساسیت..... ۱۸
۲۴. روش امحاء..... ۱۸
۲۵. پشتیبانی فنی..... ۱۸
۲۶. اطلاعات تماس..... ۱۹
۲۷. منابع..... ۱۹
۲۸. توضیحات برچسب..... ۲۰

۱. مقدمه

کیت TB RQ جهت تشخیص و کمیت سنجی DNA باکتری TB (گروه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس) 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 TB RQ امکان بررسی نمونه بیمار را جهت تشخیص و تعیین تیتر DNA باکتری‌های گروه "مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس" را به روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

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

اگرچه کشت همچنان به عنوان معتبرترین روش تشخیص توبرکولوز محسوب می‌شود، Real-Time PCR به نحو روز افزونی به عنوان روش جایگزین مطرح می‌شود که عمدتاً به دلیل سرعت، حساسیت و اختصاصی بودن نتایج آن می‌باشد. این روش در مقایسه با سایر روش‌ها دارای حساسیت بیشتر و دامنه اندازه‌گیری وسیع‌تری می‌باشد.

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 به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

۵. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
TB Mix	میکس آماده برای PCR*	۳۶۰ میکرولیتر
TB S1	استاندارد ۱: صد هزارکپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
TB S2	استاندارد ۲: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
TB S3	استاندارد ۳: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر

TB S4	استاندارد ۴: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
TB S5	استاندارد ۵: ده‌کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
Internal Ctrl	کنترل داخلی*	۲۵۰ میکرولیتر
water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

*۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های 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 می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

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 شود.
- 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 از مایکوباکتریوم
- 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.

- جهت ایمنی قبل از کار با نمونه، ابتدا آن را به روش مناسب عفونت زدایی کنید.
- 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) می باشند. 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، آن ها را کاملا ذوب نموده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل نمایید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ های 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 یخ خرد شده خودداری کنید.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگه داری و انتقال آن

خلط، مایع لاواژ برونکوآلوئولار (bronchoalveolar lavage) BAL، ترشحات برونش‌ها، مایع مغزی نخاعی (CSF) و مایع صفاقی، نمونه های مناسب برای انجام آزمایش با این کیت هستند. نمونه در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد برای چند ساعت قابل نگهداری است و برای زمان های طولانی تر می‌باید نمونه را در دمای

۲۰ درجه زیر صفر یا پایین تر نگهداری نمود در چنین شرایطی نمونه تا چند روز پایدار می‌ماند.

۱۲. 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 TB 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 TB 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 TB 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 ۱۴ استفاده نمایید.

در صورت موفق بودن PCR کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۴ می‌شود.

۱۳. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه از روش ها و کیت های مختلفی می‌توان استفاده نمود. بهتر است از کیت یا روشی استفاده کنید که اختصاصاً برای استخراج مایکوباکتریوم طراحی شده باشد. در صورتی که به چنین کیتی دسترسی ندارید، از کیت زیر نیز با اعمال تغییراتی می‌توانید استفاده کنید:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat# 51104, Qiagen, Germany)

برای توضیحات بیشتر در مورد نحوه استفاده از کیت فوق می‌توانید به راهنمای زیر مراجعه کنید.

- Artus M. tuberculosis RG PCR Kit Handbook (Cat# EN1046960, Qiagen, Germany)

در صورتی که تمایل دارید استخراج DNA از نمونه را با استفاده از کنترل داخلی بررسی نمایید، به توضیحات مربوط در قسمت ۱۲ (کنترل داخلی) مراجعه کنید.

۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

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

تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، ۵ لوله برای استانداردها 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 TB Mix اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به TB Mix اضافه نمایید، مطابق توضیحات قسمت ۱۲ میکس را آماده نموده و ۱۵ میکرولیتر از آن را به هر لوله منتقل کنید.

سپس ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده، استاندارد یا آب به هر لوله اضافه کنید.

درپوش لوله ها را ببندید و 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.

۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها

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

۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

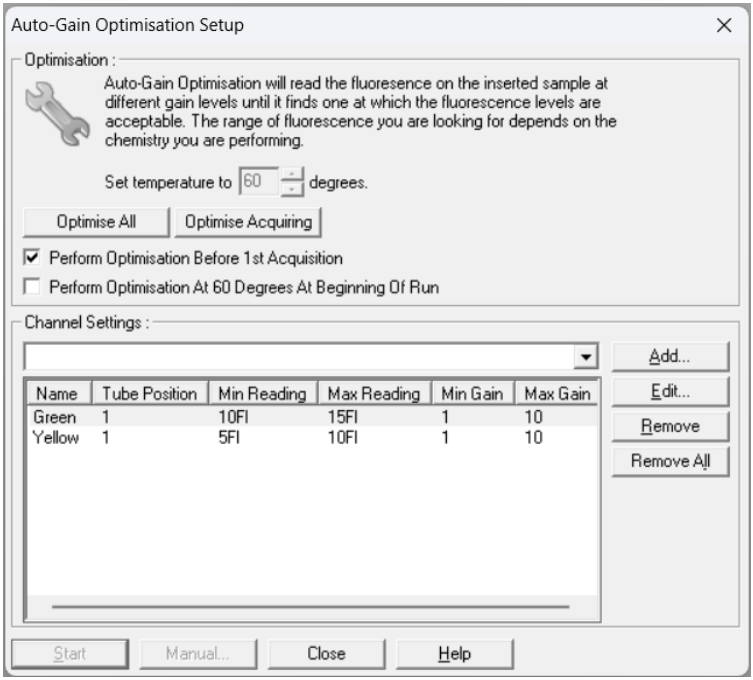
ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

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

فایل تمپلیت TB را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل TB 0.2 یا TB 0.1 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 TB 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 ذخیره کنید (save) 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 استانداردها standards را انتخاب کنید. سپس غلظت استانداردها را در ستون سمت راست با عنوان given concentration وارد کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۷. 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. یک کنترل منفی به همراه پنج استاندارد و ده نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، کنترل منفی و تعداد نمونه مورد نظر خود 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 نمایید و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات، دکمه Start Run را کلیک نموده و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های 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**	40
	60°C x 60 sec	

اندازه‌گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ‌های FAM و VIC تنظیم شود. TB Mix موجود در کیت حاوی ROX می باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

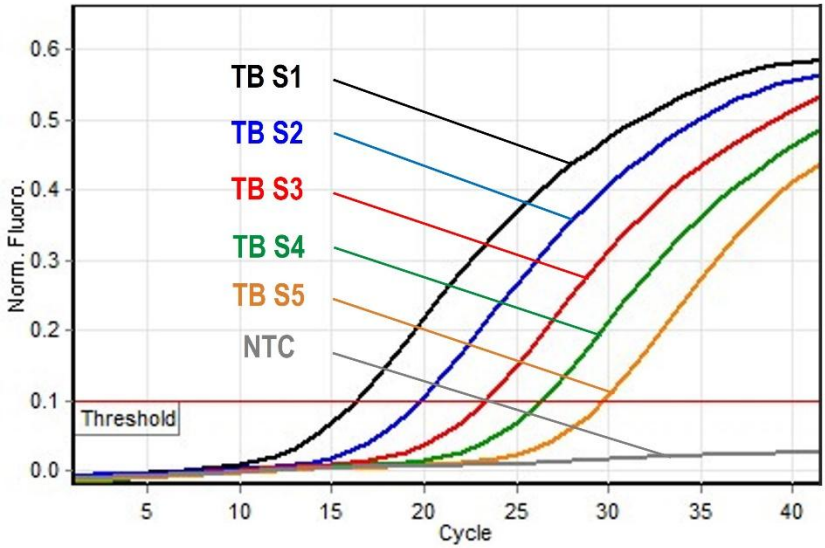
۱۹. آنالیز نتایج Rotor-Gene

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 می‌توانید به طور ساده آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. سپس در منوی Analysis مجددا Quantitation و سپس Yellow را کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید.

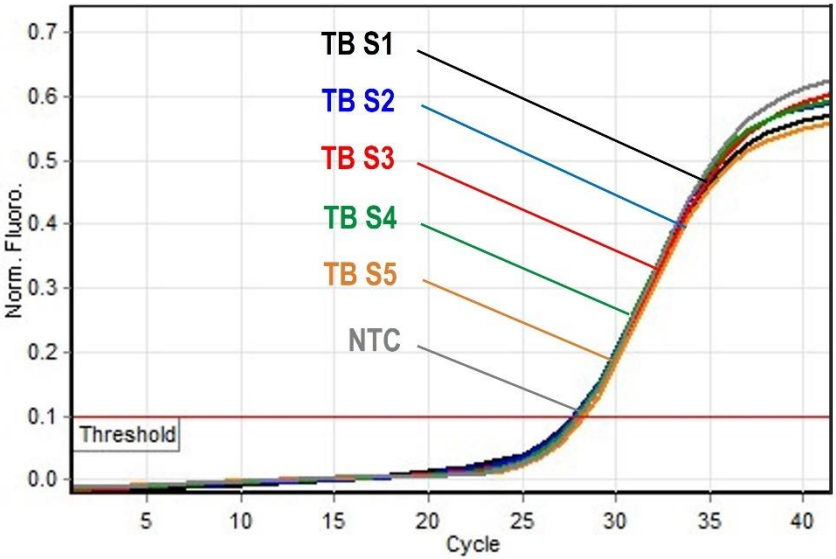
برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، شاهد منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.

دقت نمایید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **مایکوباکتریوم** 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 استانداردهای TB در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. 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 و دارای منحنی سیگموییدو CT کمتر از ۳۵ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می‌توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز منفی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموییدو CT بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش را می‌توانید در جدول صفحه ۱۷ مشاهده نمایید.

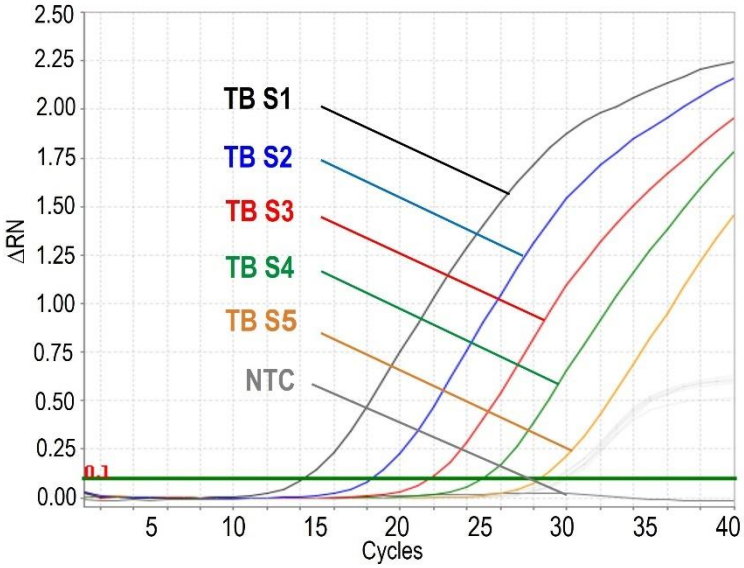
۲۰. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه، دکمه Analysis را کلیک کنید. برای TB/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای IC/VIC نیز آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید.

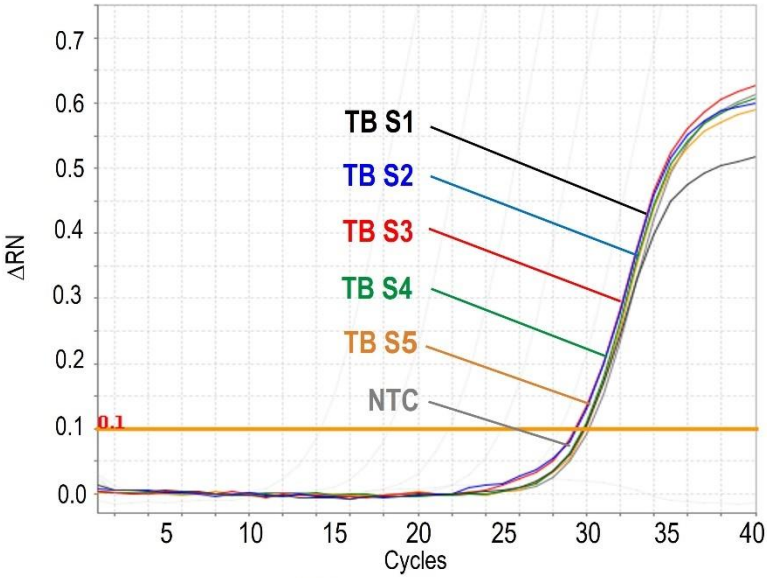
برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، شاهد منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش **تابش TB/FAM** مربوط به **مایکوباکتریوم** و افزایش **تابش IC/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.



شکل ۳. منحنی استانداردهای TB در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل ۴. منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه استپ وان

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال TB/FAM مثبت و دارای نمودار سیگموید و CT کمتر از ۳۵ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال IC/VIC می‌توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال TB/FAM منفی باشد ولی در کانال IC/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموید و CT بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال TB/FAM و IC/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

۲۱. محاسبه تیتر

هر کیت حاوی ۵ استاندارد کمّی با غلظت مشخص می‌باشد که با استفاده از آن‌ها منحنی استاندارد رسم شده و تیتر مایکوباکتریوم در نمونه بیمار معین می‌شود.

استانداردهای کیت با واحد کپی در میکرولیتر (copy/ul) مشخص شده اند. برای تبدیل نتایج به صورت کپی در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result(copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/µl)} \times \text{elution volume (µl)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

به طور مثال چنانچه ۲۰۰ میکرولیتر نمونه استخراج و DNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج باید در عدد ۲۵۰ ضرب شوند تا به کپی در میلی لیتر (copy/ml) تبدیل شوند.

۲۲. محدوده خطی

محدوده خطی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بررسی شده است و شامل بازه یک میلیون کپی در میکرولیتر تا ده کپی در میکرولیتر می‌باشد.

۲۳. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم مایکوباکتریوم بررسی شده است و معادل یک کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر 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 اطمینانی به مراتب کمتر.

۲۴. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیک 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.

۲۵. پشتیبانی فنی

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

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱
Info@novingene.com

۲۶. 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

۲۷. منابع

- Agyeman, A.A. and Ofori-Asenso, R., 2017. Tuberculosis—an overview. Journal of Public Health and Emergency, 1(7), pp.1-11 .
- Gagneux, S., 2018. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. Nature Reviews Microbiology, 16(4), pp.202-213.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212 .
- Pieters, J. and McKinney, J.D., 2013. Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis and its Interaction with the Host Organism. Springer Science & Business Media.

۲۸. 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.

TB RQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 3.5

For Real-Time PCR Detection and Quantitation of Mycobacterium Tuberculosis Complex
For Research Use Only

24 (Cat# TBRQ24)
48 (Cat# TBRQ48)
96 (Cat# TBRQ96)
NG-WI-ASL-10-305

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. Proper Specimen 6
12. Internal control (IC) 6
13. DNA Isolation 7
14. PCR Protocol 7
15. Devices and software 8
16. Programming Rotor-Gene 8
17. Programming StepOne 9
18. Programming Other Machines 10
19. Data Analysis: Rotor-Gene 10

20. Data Analysis: StepOne 12
21. Quantitation 14
22. Linear Range 15
23. Sensitivity..... 15
24. Disposal Method 15
25. Technical Support..... 15
26. Contact Information..... 15
27. References 16
28. Symbols 16

1. Introduction

TB RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting and quantifying Mycobacterium Tuberculosis Complex 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

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

3. Background Information

Tuberculosis (TB) is one of the major public health problems worldwide and results in about 2 million deaths annually. This infection is caused by a group of closely related species and subspecies of intracellular pathogens called Mycobacterium tuberculosis complex (MTC) including M. tuberculosis, M. bovis and M. bovis BCG.
While bacterial culturing is still the gold standard for TB diagnosis, Real-Time PCR is increasingly used as an alternative due to its rapid, sensitive, and specific results. It also provides the highest sensitivity and widest dynamic range among other methods.

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
TB Mix	PCR mix*	360 µl
TB S1	Standard 1: 100,000 copies/µl	150 µl
TB S2	Standard 2: 10,000 copies/µl	150 µl
TB S3	Standard 3: 1,000 copies/µl	150 µl
TB S4	Standard 4: 100 copies/µl	150 µl
TB S5	Standard 5: 10 copies/µl	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-thaws more than 3 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) application.

9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and the accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- Mycobacterium/TB DNA extraction kit
- Nuclease free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

10. General Precautions

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

- Treat all samples as potentially infectious.
- Decontaminate samples prior to DNA extraction.

- Within the pre-PCR work area, assigns three separate spaces for: a) Sample storage and extraction; b) Reagent preparation where the TB 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. Proper Specimen

Sputum, BAL (bronchoalveolar lavage), bronchial secretion, CSF and peritoneal punction are proper patient samples. Samples can be stored at 2-8°C for a few hours or at -20°C or lower for up to a few days.

12. Internal control (IC)

To assess the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition, and to prevent false negative results, the TB RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the TB Mix. To monitor both DNA extraction and PCR reaction, the IC should be added to the mixture of lysis buffer and the 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 TB 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 28-34 in the Yellow/VIC Channel.

13. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. Make sure the kit is especially manufactured for Mycobacterium/TB DNA extraction. If not available, you may use:

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

For more details, please refer to "artus® M. tuberculosis RG PCR Kit Handbook (Mat# 1046960EN, Qiagen)".

To monitor DNA extraction process, internal control should be applied to the extraction process. For more details, please, refer to section 12 of this handbook.

14. 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, five for standards and one for the negative control.

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

If the IC is added to the TB Mix, add 15ul of the prepared mix (as described in section 12) to each PCR tube.

Then add 10ul of extracted DNA, standard, or water to each tube.

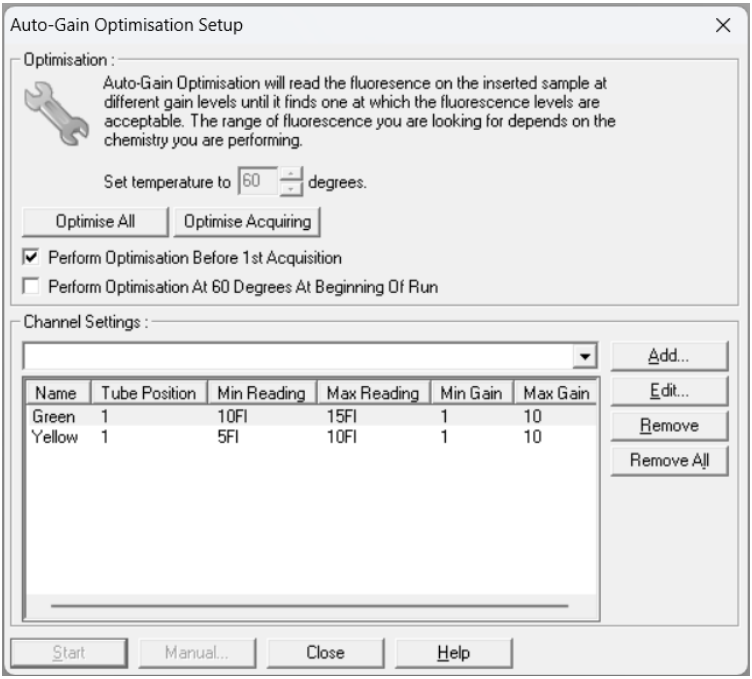
Cap the tubes and visually inspect to ensure all are caped securely. Place the tubes in the machine.
Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.
Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

15. Devices and software

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

16. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!
Open the TB template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); TB 0.1 is for strip tubes and TB 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 TB Mix).
Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the file to start the machine.



17. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). in the Set-Up menu, Open the TB template file for StepOne (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on Plate Setup. One negative control, five standards, 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.

18. 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**	40
	60°C x 60 sec	

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

19. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure that in the sample menu, all the standards have been defined as “standard” and the relative concentrations have been entered. Patient samples are defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC", respectively. the data according to the Rotor-Gene manual. Perform the quantitative analysis for the **TB (Green channel)** and qualitative analysis for the **Internal Control (Yellow channel)**. Briefly, click on Analysis menu and then, under 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. Repeat the above for “Cycling A. Yellow” but, cancel the Automatic Threshold 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.**

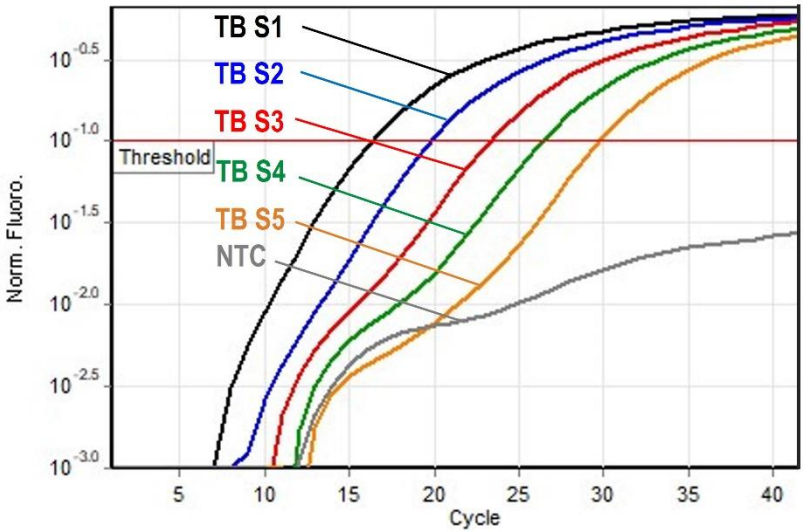


Fig 1. Typical TB graph in Green channel for Rotor-Gene

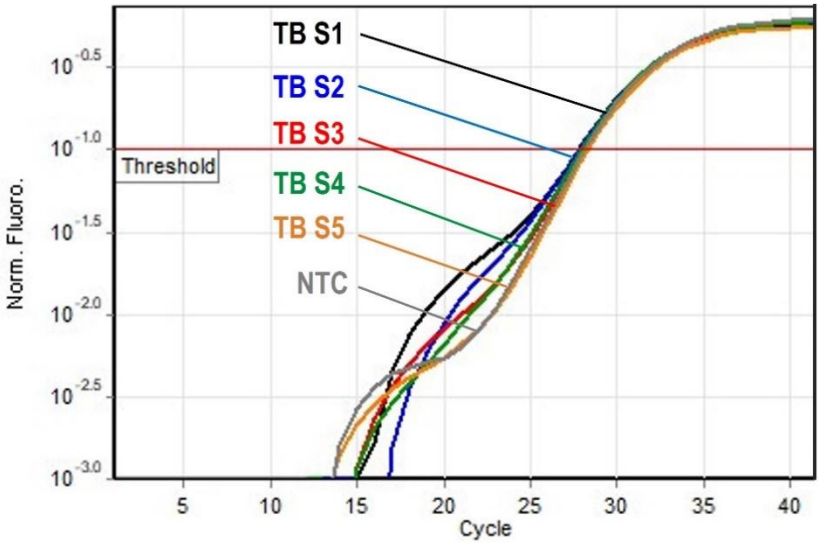


Fig 2. Typical IC graph in Yellow channel for Rotor-Gene

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 35. The titer and quantitation results in the Cycling A. Green are valid.
- 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 28-34.
- 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 14.

20. Data Analysis: StepOne

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

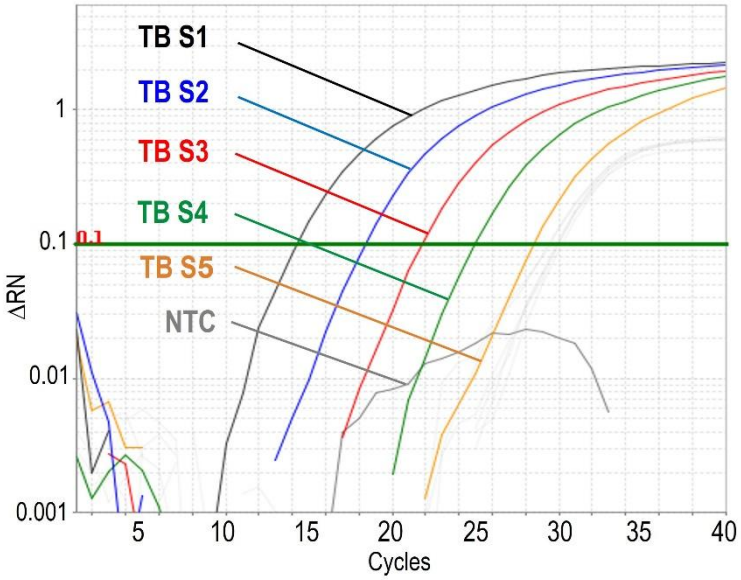


Fig 3. Typical TB graph in FAM channel for StepOne

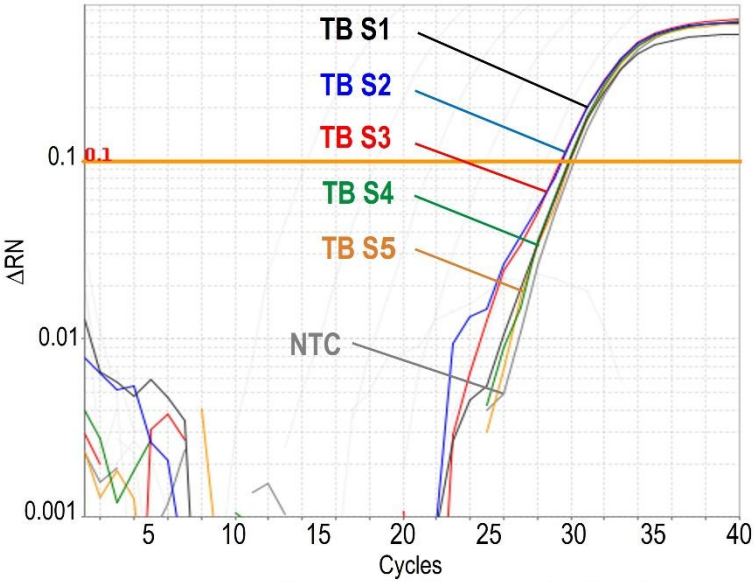


Fig 4. Typical IC graph in VIC channel for StepOne

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in the FAM/TB channel with a sigmoid graph and a CT of less than 35. The titer and quantitation results are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in the FAM/TB 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/TB and VIC/IC channels.

Interpretation of results is summarized in the following table.

Green	Yellow	Result
+	+/-	Positive
-	+ (CT: 28-34)	Negative
-	-	Inconclusive

21. Quantitation

The kit provides five quantitation standards with defined titers to generate a standard curve for the quantification of samples load. Working with Rotor-Gene machine, the standard curve from a previous run can also be imported for quantification of samples to the recent run. To do so, at least one standard must be used in the current run. Apparently, using all five standards in each run will lead to more accurate results.

Quantitation standards are defined as copy/µl. To convert the result to copy/ml the following equation should be used:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/µl)} \times \text{elution volume (µl)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

"Sample volume" is the sample volume used for DNA isolation and "Elution volume" is the volume of buffer or water used to elute or dissolve isolated DNA.

22. Linear Range

The linear range of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed to be linear in the range of 1,000,000 copies/µl to 10 copies/µl.

23. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with a cloned target and showed a limit of detection equal to 1 copy/µl.

24. 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.

25. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone: +98-9936223241
Email: info@novingene.com

26. 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

27. References

- Agyeman, A.A. and Ofori-Asenso, R., 2017. Tuberculosis—an overview. Journal of Public Health and Emergency, 1(7), pp.1-11 .
- Gagneux, S., 2018. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. Nature Reviews Microbiology, 16(4), pp.202-213.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212 .
- Pieters, J. and McKinney, J.D., 2013. Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis and its Interaction with the Host Organism. Springer Science & Business Media.

28. 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	-10°C -30°C	Temperature limit

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