راهنما کیت

Toxo RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویراش ۱/۱

جهت تشخیص DNA ویروس Toxoplasma Gondii

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

24 (Cat# ToxoRQ24)

48 (Cat# ToxoRQ48)

96 (Cat# ToxoRQ96)

NG-WI-ASL-52-101

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 ۱۷
۲۵. اطلاعات تماس ۱۸
۲۶. منابع ۱۸
۲۷. توضیحات برچسب ۱۹

۱. مقدمه

کیت Toxo RQ جهت تشخیص DNA ویروس *Toxoplasma gondii* 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 ثانویه‌ای 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 Toxo RQ امکان بررسی نمونه جهت تشخیص *Toxoplasma gondii* با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

توکسوپلاسما گوندی (*Toxoplasma gondii*) یک انگل آغازی است که باعث ایجاد بیماری توکسوپلاسموزیس (toxoplasmosis) در انسان و جانوران خونگرم می‌شود. در بین جانوران، گربه ها به عنوان ناقل اصلی این انگل بشمار میروند. این انگل از طریق مصرف گوشت خام جانوران ناقلی مانند گربه و خوک و یا تماس با اجسام آلوده به توکسوپلاسما منتقل می‌گردد. این انگل در اغلب موارد در فرد سالم بدون علائم ظاهر می‌شود اما در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی، خانم های باردار و همچنین کودکانی که به صورت مادرزادی آلوده شده اند، با حمله به لنف و خون منجر به نکروز اندام های مختلف و علائم

دیگری می‌شود. تشخیص زودهنگام این بیماری جهت شروع به موقع درمان بیماران از اهمیت بالایی برخوردار است.

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، یک یک فلش کارت و مواد زیر می باشد:

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

*۱، ۲، 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 می باشد.

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 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-TimePCR 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 و تجهیزات و لوازم مورد نیاز آن
- 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 انتقال میکس به میکروتیوب 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 تیوب های کیت، آن ها را روی یخ خرد شده نگهداری کنید تا کاملاً ذوب شود. سپس با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر تیوب اطمینان حاصل کنید. 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.
- از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارآیی آنها می‌شود.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش توکسوپلاسما، نمونه به دست آمده از مایع آمنیوتیک، خون و مایع مغزی نخاعی می‌باشد. نمونه در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد برای چند ساعت قابل نگهداری است و برای زمان های طولانی تر می‌باید 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 می شود. 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 بیلی روبین (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 Toxo 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 Toxo 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 Toxo 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 PCR منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۲ در دستگاه RorGene و ۲۸ تا ۳۴ در دستگاه StepOne می‌شود.

۱۴. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه از روش ها و کیت های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می‌کنیم:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی تیوب های کیت 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. به تعداد مورد نیاز میکروتیوب PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، یک میکروتیوب برای شاهد مثبت و یک میکروتیوب برای کنترل منفی (آب) نیز در نظر بگیرید.

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

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به Toxo 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 مثبت یا آب به هر لوله اضافه کنید

در پایان درپوش میکروتیوب 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 Toxo 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!

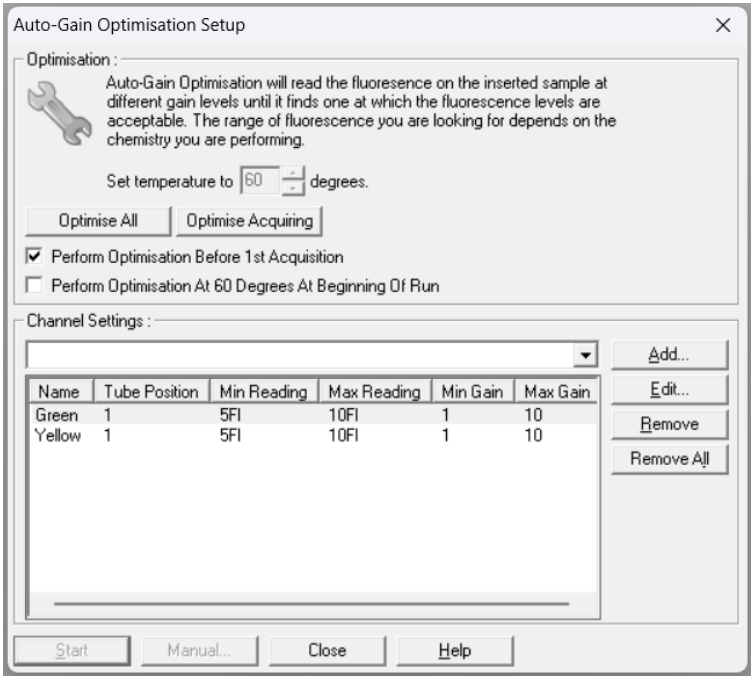
دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

فایل تمپلیت Toxo را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل Toxo 0.1 یا Toxo 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 Toxo 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 AssignTargets 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 این‌کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می‌توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز می توانید اضافه کنید و نام نمونه ها را 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 دستگاه های Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید.

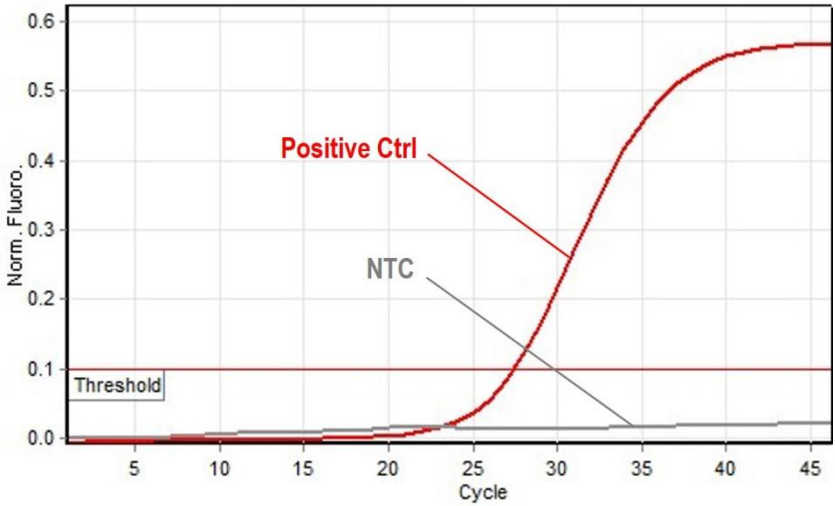
Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

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

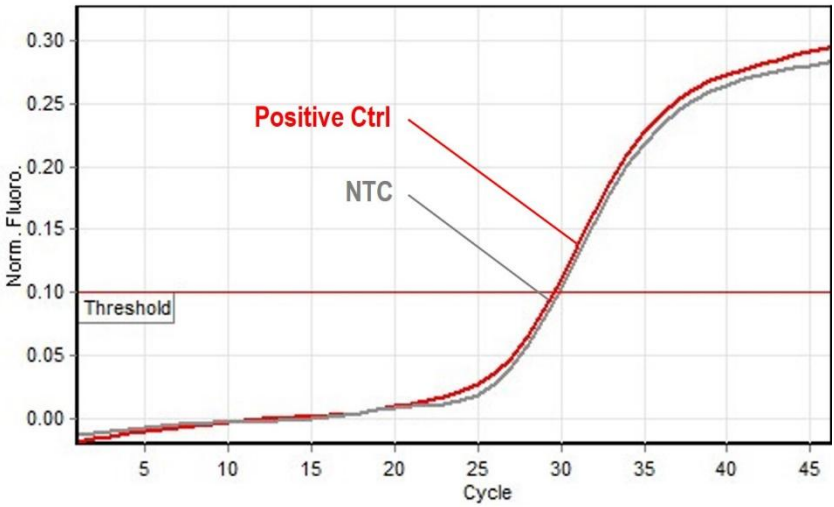
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

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. سپس 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 **Toxoplasma** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.



شکل ۱. منحنی کنترل ها در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل۲. منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی 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 می باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

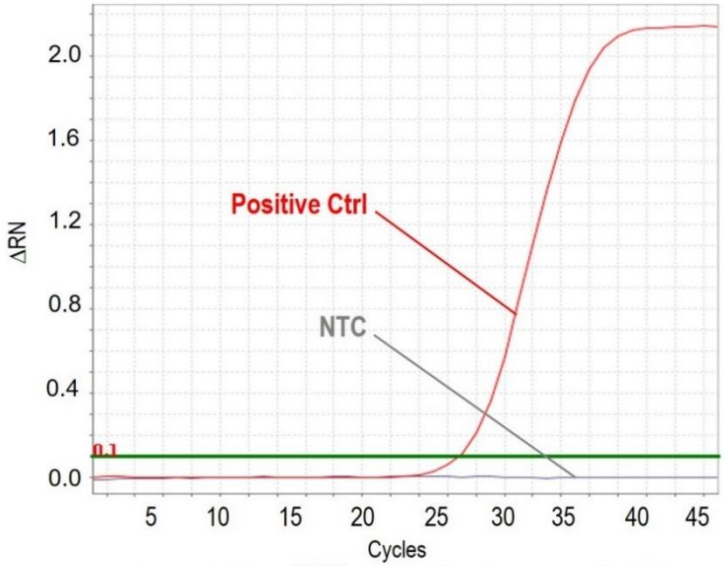
- در صورتی که نمونه در کانال **سبز** مثبت با CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال **زرد** می‌توان آن را **مثبت** گزارش کرد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال **سبز** منفی باشد ولی در کانال **زرد** مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۲ باشد، نمونه از نظر توکسوپلاسما **منفی** 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

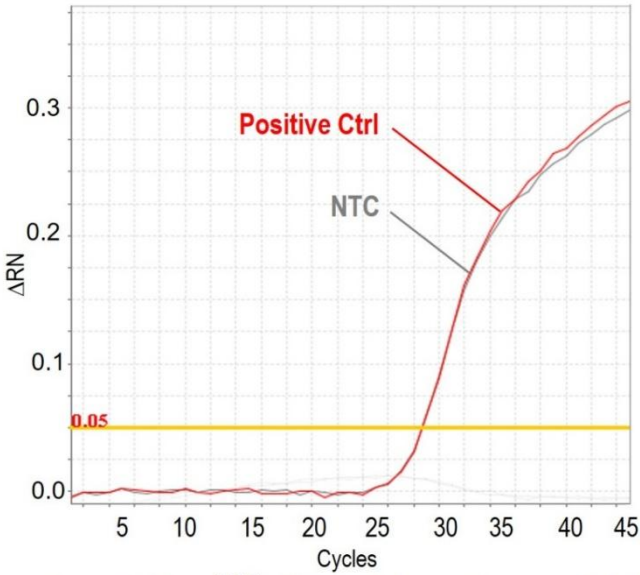
برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای VIC روی ۰/۰۵ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدهای مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر ۳، ۴ را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش **تابش FAM** مربوط به **Toxoplasma** و افزایش **تابش VIC** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.

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



شکل ۳. منحنی شاهدها 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 **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 **سبز** منفی باشد ولی در کانال **VIC** مثبت و دارای منحنی سیگموید با CT بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه از نظر توکسوپلاسما **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 در جدول زیر آمده است.

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

۲۲. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم توکسوپلاسما گوندی بررسی شده است و معادل ۴ کپی در میکرولیتر می‌باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر انگل 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 آدرس 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

- Adem, D.M. and Ame, M.M., 2023. Toxoplasmosis and its Significance in Public Health: A Review. Journal of Biomedical and Biological Sciences, 2(1), pp.1-20.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.
- Smith, N.C., Goulart, C., Hayward, J.A., Kupz, A., Miller, C.M. and van Dooren, G.G., 2021. Control of human toxoplasmosis. International Journal for Parasitology, 51(2-3), pp.95-121.

- Weiss, L.M. and Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. International journal for parasitology, 39(8), pp.895-901.

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.

Toxo RQ
Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.1

For Real-Time PCR Detection of Toxoplasma Gondii
For Research Use Only

Σ 24 (Cat# ToxoRQ24)
Σ 48 (Cat# ToxoRQ48)
Σ 96 (Cat# ToxoRQ96)
NG-WI-ASL-53-101

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

20. Data Analysis: Rotor-Gene 10
21. Data Analysis: StepOne 12
22. Sensitivity 14
23. Disposal Method 14
24. Technical Support 15
25. Contact Information 15
26. References 15
27. Symbols 16

1. Introduction

Toxo RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting *Toxoplasma gondii* 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

Toxo RQ kit is intended for detecting *Toxoplasma gondii* in DNA samples extracted from human. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene, StepOne and MIC machines.

3. Background Information

Toxoplasma gondii is a parasitic protozoan that causes toxoplasmosis in warm-blooded animals. Cats are the definitive host for *Toxoplasma gondii*, but several intermediate hosts also exist. It is usually transmitted from infected meat or cat feces. *Toxoplasma gondii* is asymptomatic in most humans but it causes various symptoms in immunocompromised patients, pregnant women, and congenitally infected children with toxoplasmosis.

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
Toxo 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 respectively.

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 accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit and required equipments/items
- 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 master-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 on ice kit components completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.

- Keep PCR Mix tube at -20°C at all times. Take it out just before use and return it to freezer immediately after.
- Do not place 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cold block instead.

11. Specimen, Storage and Transport

We recommend amniotic fluid, blood and CSF. Sample can be stored at 2-8°C for 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 Toxo RQ kit contains an internal control (IC). This IC can be used during the extraction process or added directly to the Toxo 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 Toxo Mix, only PCR inhibition can be monitored. For this purpose, 1ul of the IC reagent should be added to each reaction. For example, for 10 PCR reactions, 15ul of the internal control should be added to 150ul of Toxo 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 RotorGene and 28-34 in the VIC channel on StepOne.

14. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, 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 plus one for positive control and one for negative control (water).

If the IC is introduced during the extraction process, pipette 15µl of the Toxo Mix to each PCR tube.
If the IC is added to the Toxo Mix, add 15ul of the prepared mix (as described in section 13) to each PCR tube.
Then add 10ul of isolated DNA, Positive Control, or water to each tube.
Cap the tubes and visually inspect to 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

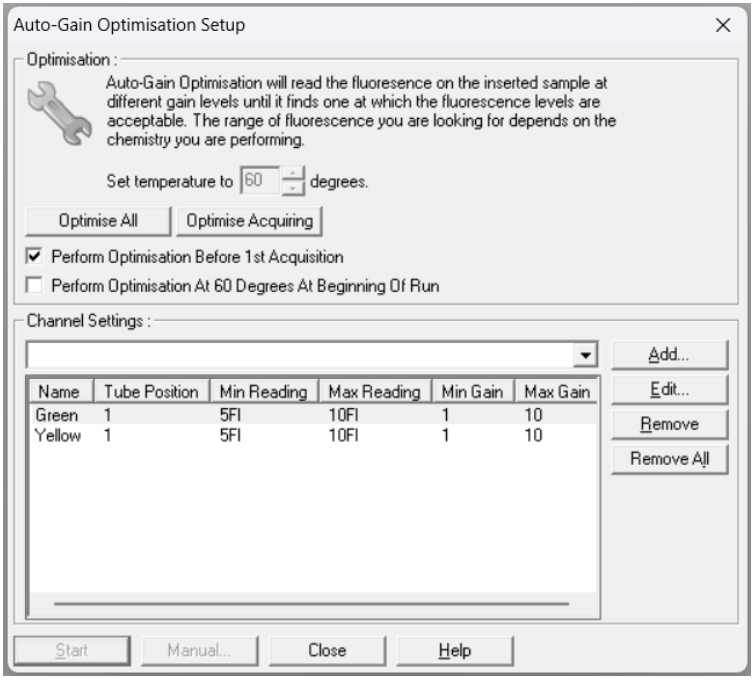
Toxo RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

17. Programming of the Rotor-Gene

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

Open the Toxo template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); Toxo 0.1 is for strip tubes and Toxo 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 Toxo 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 desired location.

18. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu, click on Template (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on "Plate Setup". Controls and a few samples are defined. You may change plate setup using right-click options (copy, past, clear). You may also add or remove samples on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment to the desired location. 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. PCR Mix contains ROX with the final concentration of 300nM in the reaction.

20. Data Analysis: Rotor-Gene

To analyze data briefly, click on Analysis menu and then under Quantitation tab double-click on Cycling A. Green. Manually put threshold at 0.1. Repeat the above for the Yellow and Orange Channels. Figures 1 and 2 represent typical graphs for the Rotor-Gene. To interpret the results, please note that:
Signal in the **Green** channels is due to **Toxoplasma** and a signal in the **Yellow channel** is due to **IC**.

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.

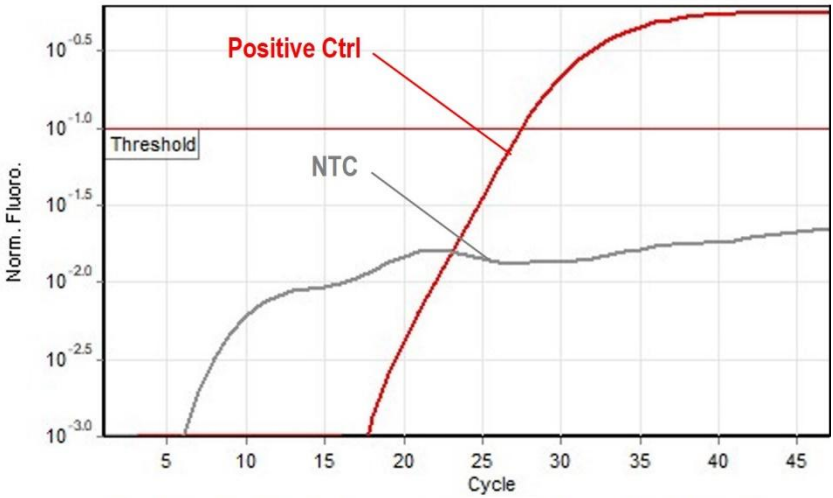


Fig 1. Typical Controls graph in Green channel for Rotor-Gene

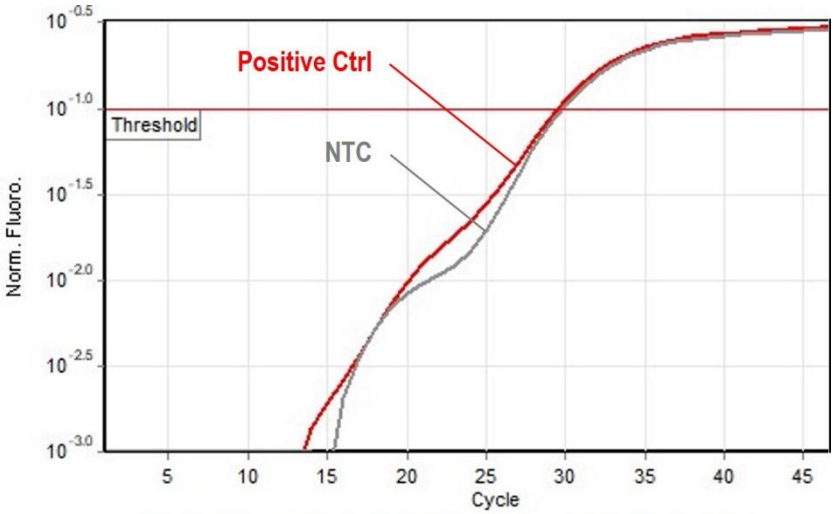


Fig 2. Typical IC graph in Yellow channel for Rotor-Gene

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for *Toxoplasma gondii* if it is positive in the Green channel with sigmoid graphs and CT of less than 40.
- A sample is **Negative** for *Toxoplasma gondii* 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.

21. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to StepOne manual. Briefly, click on Analyze and set the threshold for the **FAM** channel at 0.1 and 0.05 for the **VIC** channel. To interpret the results, please note that signal in the **FAM** channels is due to **Toxoplasma**, and a signal in the **VIC** channel is due to **IC**.

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.

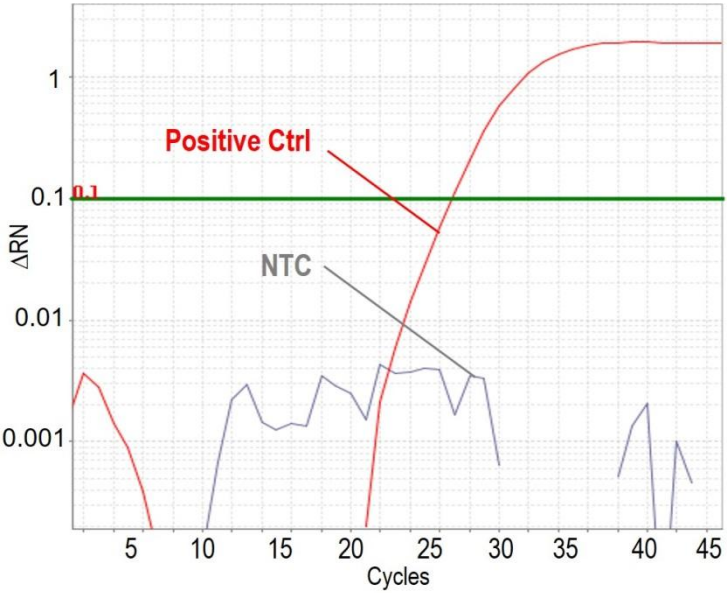


Fig 3. Typical Control graph in FAM channel for StepOne

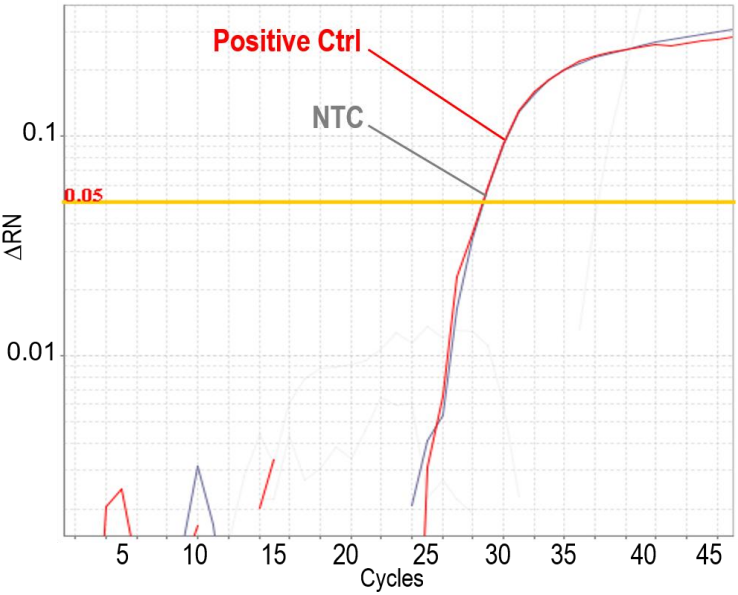


Fig 4. Typical IC graph in VIC channel for StepOne

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for *Toxoplasma gondii* if it is positive in the FAM channel with sigmoid graphs and CT of less than 40.
- A sample is **Negative** for *Toxoplasma gondii* if it is negative in the FAM channel while it is positive in the VIC 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 and VIC channels.

The interpretation of the 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 cloned target, of *Toxoplasma gondii* genome and showed a limit of detection equal to 4 copy/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

- Adem, D.M. and Ame, M.M., 2023. Toxoplasmosis and its Significance in Public Health: A Review. Journal of Biomedical and Biological Sciences, 2(1), pp.1-20.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical microbiology and infection, 10(3), pp.190-212.
- Smith, N.C., Goulart, C., Hayward, J.A., Kupz, A., Miller, C.M. and van Dooren, G.G., 2021. Control of human toxoplasmosis. International Journal for Parasitology, 51(2-3), pp.95-121.
- Weiss, L.M. and Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. International journal for parasitology, 39(8), pp.895-901.

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	-10°C -30°C	Temperature limit

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