Delta Pneumocystis Real-time PCR Kit

دستورالعمل

REF DD003-001-24

24 tests

کیت تشخیص کیفی قارچ پنوموسیستیس جیرووسی بر اساس تکنیک ریل تایم پی‌سی‌آر

DELTA BIOTECHNOLOGY
دلتا تشخیص آریا (دلتا)

۱) کاربرد کیت

کیت Delta Pneumocystis Real-time PCR به منظور انجام یک تست تشخیصی In vitro کیفی بر پایه‌ی تکنیک Probe-based real-time PCR طراحی شده است که برای تشخیص DNA ژنومی قارچ پنوموسیستیس جیرووسی (کارینی) در نمونه‌های بالینی حاصل از ترشحات برونکوپولمونواری استفاده می‌شود. نتایج مثبت حاصل از انجام این تست، تاییدکننده‌ی وجود DNA ژنومی قارچ پنوموسیستیس است و نتایج منفی رد کننده عفونت PCP با این قارچ نیست و نتایج باید در ترکیب با یافته‌های بالینی، شرح حال بالینی بیمار و اطلاعات اپیدمیولوژیکی بکار گرفته شوند. لازم به ذکر است که نتایج مثبت حاصل از تست، ردکننده‌ی وجود سایر عفونت‌های باکتریایی و ویروسی همراه نمی‌باشد.

۲) اساس تست

در این روش، یک ناحیه در ژن *MSG* قارچ پنوموسیستیس جیرووسی بعنوان هدف تشخیصی در فرآیند PCR تکثیر می‌شوند. برای این منظور، ابتدا DNA ژنومی با استفاده از یک کیت تجاری معتبر استخراج می‌شود و بدنبال آن، واکنش تکثیر هدف ژنومی انجام می‌شود. به‌منظور شناسایی ناحیه‌ی هدف از یک ست پرایمر و پروب اختصاصی الیگونوکلئوتیدی دارای فلوروفور و کوئنچر استفاده می‌شود. یک پروب که دارای فلوروفور FAM است جهت شناسایی ژن *MSG* قارچ پنوموسیستیس جیرووسی و پروب دیگر دارای فلوروفور HEX است که جهت شناسایی بخشی از یک ژن Housekeeping انسانی بعنوان کنترل داخلی (Endogenous control) استفاده می‌شود. حین انجام PCR در صورت وجود ژنوم هدف، پرایمرها و پروب‌های اختصاصی به نواحی مربوطه متصل می‌شوند. به‌منظور تکثیر DNA هدف، آنزیم پلیمراز فعال شده و شروع به سنتز رشته‌های جدید می‌کند. در حین سنتز رشته‌های جدید، این آنزیم با استفاده از فعالیت اگزونوکلئازی باعث هیدرولیز پروب‌های متصل شده به نواحی هدف مربوطه شده و در نتیجه کوئنچر از فلوروفور جدا شده و در نتیجه رنگ‌های فلوروسنت مختلف آزاد می‌شوند که دستگاه Real-time PCR قادر به خواندن و ثبت آن‌ها می‌باشد. در نهایت بعد از پایان واکنش PCR نتایج با استفاده از نرم افزار مربوطه آنالیز می‌شوند. لازم به ذکر است که کنترل داخلی، جهت ارزیابی فرآیند نمونه‌گیری و استخراج ژنوم قارچ کاربرد دارد.

۳) محتوای کیت

کیت حاضر برای انجام ۲۴ تست تشخیصی است و دارای اجزای زیر می‌باشد:

	ریجنت‌ها*	مقادیر
۱	PCP Master Mix	۱ تیوب X ۳۶۰ میکرولیتر
۲	PCP Positive Control	۱ تیوب X ۵۰ میکرولیتر
۳	No Template Control (NTC)	۱ تیوب X ۵۰ میکرولیتر

* **توجه:**
- ✓ تمامی اجزای کیت در دمای ۱۵- تا ۲۵- درجه سانتیگراد نگهداری شوند.
- ✓ تاریخ انقضای کیت بر روی آن درج شده است.
- ✓ تا حد امکان از ذوب و فریز شدن اجزای کیت خودداری شود (کمتر از ۵ بار).
- ✓ در صورت نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، در کمتر از یک هفته استفاده شود.
- ✓ در صورت نیاز از هرکدام از اجزا بر اساس نیاز الیکوت تهیه شود.
- ✓ محلول Mastermix حاوی پرایمر و پروب نشاندار شده با مواد فلوروسنت است و تا حد امکان در معرض نور مستقیم قرار نگیرد.
- ✓ حتما قبل از استفاده از هرکدام از محلول‌های موجود در کیت، ورتکس/ اسپین انجام شود.

۴) سایر تجهیزات و مصرفی‌های لازم

	دستگاه / مصرفی	تعداد	توضیحات
۱	ورک استیشن (کابینت PCR)	۲ عدد	یکی برای تهیه PCR mix و دیگری برای اضافه کردن DNA قارچی و کنترل‌های کیت است.
۲	ست سمپلر با حجم‌های مختلف	۲ ست	هر یک ست در زیر هر ورک استیشن قرار داده شود.
۳	مینی اسپین / ورتکسر	۲ عدد	هر کدام در زیر هر ورک استیشن قرار داده شود.
٤	مینی اسپین با روتور استریپ خور یا سانتریفیوژ پلیت خور	۱ عدد	به منظور سانتریفیوژ کردن استریپ تیوب‌ها یا پلیت حاوی واکنش PCR قبل از قرار دادن در دستگاه Real-time PCR استفاده می‌شود.
۵	دستگاه Real-time PCR	۱ عدد	دستگاه دارای قابلیت خوانش در حداقل ۲ کانال FAM و HEX یا معادل طول موج آن‌ها باشد
٦	کول رک (کرایو رک)	به تعداد لازم	برای حمل و نگهداری بافرها و نمونه‌های DNA در حین کار استفاده می‌شود.
۷	استریپ تیوب یا پلیت مخصوص Real-time PCR	به تعداد لازم	بر اساس نوع دستگاه Real-time PCR از نوع سفید یا شفاف استفاده می‌شود.
۸	اسپری حاوی محلول از بین برنده نوکلئازها (RNaseZAP)	به مقدار لازم	به منظور تمیز کردن سطوح و تمامی وسایل استفاده می‌شود.
۹	سر سمپلر فیلتر دار در حجم‌های مختلف	به تعداد لازم	باید عاری از DNase و RNase باشند.

۵) نمونه‌ی بالینی مورد استفاده

تشخیص اختصاصی بر اساس شناسایی پنوموسیستیس جیرووسی در ترشحات برونکوپولمونواری بدست آمده از خلط (Induced sputum) و لاواژ برونکوالوئولار (BAL) می‌باشد. در مواقعی که این دو روش را نتوان استفاده نمود، انجام بیوپسی ترنس‌برونشیال یا بیوپسی از ریه‌ی باز ضروری است.
- ✓ نمونه‌گیری بر اساس گایدلاین CDC انجام شود:
(https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/other/bal.html).
- ✓ نمونه‌های گرفته شده را می‌توان تا قبل از ۴۸ ساعت در دمای ۲- تا ۸- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری نمود. در غیر اینصورت، نمونه‌ها در دمای ۲۰- یا ۷۰- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شوند.
- ✓ DNA قارچی استخراج شده از نمونه‌های بالینی را می‌توان به مدت طولانی در دمای ۲۰- یا ۷۰- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری نمود.
- ✓ کارایی و پرفورمنس کیت حاضر بستگی به مقدار و کیفیت DNA استخراج شده دارد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود از یک کیت یا یک روش استخراج DNAمناسب (چه دستی و چه اتوماتیک) استفاده شود.

٦) ایمنی زیستی

- ❑ در حین کار با نمونه‌های بالینی حتما از وسایل حفاظتی (مثل دستکش، گان، ماسک و عینک محافظ) استفاده شود.
- ❑ کار با نمونه‌های بالینی، حتما در زیر هود میکروبیولوژیکی کلاس ۲ یا بالاتر انجام گیرد.
- ❑ تمامی مراحل انجام کار باید توسط افراد آموزش دیده انجام شود.
- ❑ دور ریختن بافرها، ریجنت‌ها و نمونه‌ها بر اساس مقررات و گایدلاین‌های مربوطه انجام شود: https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6206.pdf

۷) پروتکل انجام تست

قبل از انجام تست تمامی اجزای کیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شوند تا به آرامی ذوب شوند. استفاده از کرایورک به منظور نگهداری محلول‌ها در این مرحله پیشنهاد می‌شود. سپس برای حل کردن و هموژن کردن محلول‌ها از ورتکس استفاده شود. در مرحله بعد تمامی محلول‌ها اسپین شوند تا در صورتی که قطرات محلول روی درب تیوب‌ها باشد به ته میکروتیوب کشیده شود.

۱-۷) در زیر یک ورک استیشن، به ازای هر نمونه مقدار **۱۵ میکرولیتر** از PCP Master mix را درون هر چاهک از پلیت مخصوص Real-time PCR (یا هر تیوب از استریپ تیوب ۸تایی) اضافه نمایید.

۲-۷) در زیر یک ورک استیشن دیگر مقدار **۵ میکرولیتر** از هر یک از DNAهای استخراج شده‌ی قارچی را به میکس مرحله‌ی قبل اضافه و اسپین نمایید.

نکات:
- ✓ در این مرحله، بطور موازی مقدار ۵ میکرولیتر از هر کدام از کنترل‌های مثبت PCP Positive Control و کنترل منفی No Template Control موجود در کیت را نیز به‌صورت جداگانه به چاهک حاوی میکس واکنش اضافه شوند.
- ✓ در حین انجام کار به‌منظور حفظ کیفیت DNAهای استخراج شده، پس از خارج کردن آن‌ها از فریزر، آن‌ها را برروی کرایورک مخصوص حمل و نگهداری نمایید.

۳-۷) واکنش‌ها را به دستگاه Real-time PCR منتقل کرده و برنامه‌ی آورده شده در جدول زیر را اجرا نمایید.

سیکل	مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ثانیه)
۱ x	فعال شدن آنزیم پلیمراز	۹۵	۳۰۰
۴۵ x	باز شدن رشته‌های DNA الگو	۹۵	۱۵
	جفت شدن پرایمرها	۵۵	۱۵
	سنتز رشته های جدید	۷۲	۳۰ *
۱ x	خنک شدن	۲۵	۳۰

* خوانش فلوروسنت در کانال‌های **FAM** و **HEX** در این مرحله انجام شود و در صورت نیاز Passive reference dye (ROX) در حالت خاموش قرار داده شود (بعنوان مثال در دستگاه‌های ساخت کمپانی Applied Biosystems یا دستگاهای مشابه).

۴-۷) بعد از انجام PCR، تفسیر نتایج بر اساس جدول زیر انجام شود.

تفسیر	HEX	FAM
وجود DNA ژنومی قارچ پنوموسیستیس جیرووسی (جواب تست مثبت است)	±	+
عدم وجود DNA ژنومی قارچ پنوموسیستیس جیرووسی (جواب تست منفی است)	+	-
نمونه گیری به درستی انجام نشده است (تکرار آزمایش) استخراج ژنوم به درستی انجام نشده است (تکرار آزمایش) احتمال وجود مهارکننده‌ی PCR در نمونه‌ی استخراج شده (تکرار آزمایش)	-	-

- مقادیر Ct (Cq) مساوی یا کمتر از ۳۷ بعنوان مثبت از نظر وجود قارچ پنوموسیستیس و مقادیر بزرگتر از ۳۷ بعنوان منفی از نظر وجود این قارچ در نظر گرفته شوند.
- پروب شناسایی کننده‌ی قارچ پنوموسیستیس با رنگ فلوروسنت FAM و پروب شناسایی کننده‌ی ژن Housekeeping انسانی (بعنوان کنترل داخلی) با رنگ HEX نشاندار شده است.
- کیت حاضر دارای ۲ نوع نمونه‌ی کنترل مثبت و منفی است. مقادیر Ct هر دو کانال FAM و HEX برای کنترل مثبت کمتر از ۳۵ می‌باشند. نمونه‌ی کنترل منفی کیت حاضر آب عاری از نوکلئاز است که بعنوان NTC در نظر گرفته می‌شود. در صورت وجود آلودگی ریجنت‌های کیت با DNA قارچی یا آلودگی‌های تکنیکی در حین آماده سازی واکنش PCR، ممکن است که رنگ فلوروسنت در کانال‌های مذکور توسط دستگاه خوانش شود. در صورت مشاهده‌ی مقادیر Ct برای نمونه‌ی NTC پیشنهاد می‌شود تا آزمایشات تکرار شوند.

علائم اختصاری

REF کاتالوگ نامبر	RUO استفاده تحقیقاتی
LOT لات نامبر	تاریخ انقضا
دستورالعمل	محدوده های نگهداری
تعداد تست‌ها	کمپانی تولید کننده

آدرس: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز رشد فناوری
شماره تماس: ۰۳۱۹۱۰۱۰۶۵۱ ۰۲۱۹۱۰۱۰۶۵۱
وبسایت: www.deltabiotechno.com