Delta Leishmania Real-time PCR Kit

دستورالعمل

کیت تشخیص افتراقی لیشمانیازیس پوستی بر اساس مالتیپلکس ریل تایم پی‌سی‌آر

DELTA BIOTECHNOLOGY
دلسا تشخیص آریا (دلتا)

REF DD050-001-24

24 tests

۱) کاربرد کیت

کیت Delta Leishmania Real-time PCR به منظور انجام یک تست تشخیصی In vitro کیفی بر پایه‌ی تکنیک Multiplex probe-based real-time PCR طراحی شده است که برای تشخیص (Detection) انواع گونه‌های انگل لیشمانیا و همچنین تشخیص افتراقی (Identification) لیشمانیا ماژور (*L.major*) در نمونه‌های حاصل از زخم‌های پوستی افراد مشکوک به لیشمانیاریس پوستی (Cutaneous leishmaniasis) استفاده می‌شود.

۲) اساس تست

در این روش، یک ناحیه‌ی اختصاصی در ژن *ND1* بر روی کینتوپلاست *L.major* و یک ناحیه‌ی حفظ شده (Conserved region) در ژن *18s rDNA* برروی ژنوم انواع گونه‌های انگل لیشمانیا بعنوان اهداف تشخیصی در فرآیند Multiplex PCR تکثیر می‌شوند. برای این منظور، ابتدا DNA ژنومی موجود در نمونه‌ی بالینی 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 رنگ فلوروسنت (فلوروکروم) و کوئنچر استفاده می‌شود. یک پروب دارای فلوروکروم FAM جهت شناسایی ژن *ND1* انگل *L.major* و پروب دیگر دارای فلوروکروم HEX جهت شناسایی ژن *18s rDNA*استفاده می‌شود. بعلاوه یک پروب دیگر که دارای فلوروکروم Texas red (TxRed) است جهت شناسایی بخشی از یک ژن Housekeeping انسانی بعنوان کنترل داخلی (Internal 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 فلوروکروم جدا شده و در نتیجه فلوروکروم‌های مربوط به پروب‌های مختلف ساطع می‌شوند که دستگاه Real-time PCR قادر به خوانش 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 کاربرد دارد.

۳) محتوای کیت

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

	ریجنت‌ها*	مقادیر
۱	Leishmania Master Mix	۱ تیوب X ۳۶۰ میکرولیتر
۲	L.major Positive Control	۱ تیوب X ۱۰۰میکرولیتر
۳	L.tropica Positive Control	۱ تیوب X ۱۰۰میکرولیتر
٤	No Template Control (NTC)	۱ تیوب X ۱۰۰ 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. زیرا ممکن است حساسیت تست را کاهش دهد.
- ✓ 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 Master mix حاوی پرایمر و پروب نشاندار شده با فلوروکروم 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 ژنومی 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 سانتریفوژ 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 ۳ کانال FAM، HEX و Texas red 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

بر اساس پروتکل نمونه‌گیری CDC آمریکا می‌توان از نمونه‌های بدست آمده از بیوپسی، آسپیراسیون (Needle aspiration) یا خراشیدن (Scraping) محل زخم، استفاده نمود:
https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/resources/pdf/Leishmaniasis_Guide_Collection_2021.pdf

تشخیص اختصاصی بر اساس شناسایی DNA انگل لیشمانیا (گونه‌ی ماژور یا سایر گونه‌ها مثل ترورپیکا) در نمونه‌های بالینی حاصل از زخم افراد مشکوک به لیشمانیازیس پوستی (روستایی و شهری) انجام می‌شود. کارایی و پرفورمنس کیت حاضر بستگی به مقدار و کیفیت DNA استخراج شده دارد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود از یک کیت یا یک روش استخراج DNA مناسب (چه دستی و چه اتوماتیک) استفاده شود. 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://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9780471729259.mc01a01s13

٦) 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.

٦-۱) در زیر یک ورک استیشن، به ازای هر نمونه مقدار **۱۵ میکرولیتر** از Leishmania Master mix را درون هر چاهک از پلیت مخصوص Real-time PCR (یا هر تیوب از استریپ تیوب ۸تایی) اضافه نمایید.

٦-۲) در زیر ورک استیشن دیگر مقدار **۵ میکرولیتر** از هر یک از DNAهای استخراج شده را به میکس مرحله‌ی قبل اضافه و اسپین نمایید.

نکات:

- ✓ در این مرحله، بطور موازی مقدار ۵ میکرولیتر از هر کدام از کنترل‌های مثبت L.major Positive Control، L.tropica Positive Control و کنترل منفی No Template Control (NTC) موجود در کیت نیز به‌صورت جداگانه به یک 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.

٦-۳) واکنش‌ها را به دستگاه Real-time PCR منتقل کرده و برنامه‌ی آورده شده در جدول زیر را اجرا نمایید.

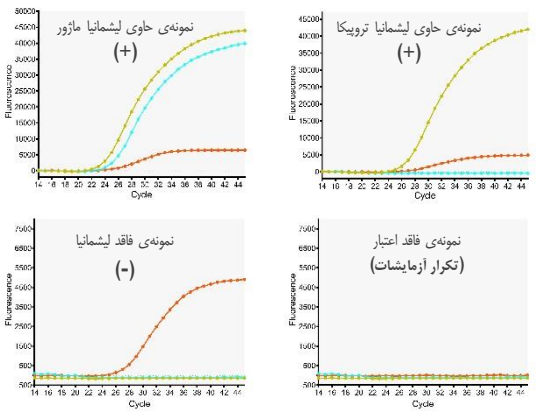
سیکل	مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ثانیه)
۱ x	فعال شدن آنزیم پلیمراز	۹۵	۳۰۰
	باز شدن رشته‌های DNA الگو	۹۵	۱۵
۴۵ x	جفت شدن پرایمرها	۵۸	۱۵
	سنتز رشته های جدید	۷۲	۳۰ *
۱ x	خنک شدن	۲۵	۳۰

* خوانش فلوروسنت در کانال‌های **FAM** ، **HEX** و **Texas red** 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).

٦-۴) بعد از انجام PCR، تفسیر نتایج بر اساس جدول زیر انجام شود.

تفسیر	TxRed	HEX	FAM
وجود DNA ژنومی *L.major* (جواب تست مثبت است)	±	+	+
وجود DNA ژنومی سایر گونه‌های لیشمانیا (مثلا *L.tropica*)(جواب تست مثبت است)	±	+	-
عدم وجود DNA ژنومی انگل لیشمانیا (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 ۳۵ بعنوان مثبت از نظر وجود انگل لیشمانیا و مقادیر بزرگتر از ۳۵ بعنوان منفی از نظر وجود این انگل در نظر گرفته شوند. پروب شناسایی کننده‌ی *L.major* با فلوروکروم FAM، پروب شناسایی کننده‌ی سایر لیشمانیاها (مانند *L.tropica*) با فلوروکروم HEX و پروب شناسایی کننده‌ی ژن Housekeeping انسانی (بعنوان کنترل داخلی) با Texas red نشاندار شده است (شکل زیر).



○ کیت حاضر دارای ۲ نوع نمونه‌ی کنترل مثبت و یک کنترل منفی است.

- ✓ مقادیر Ct هر سه کانال FAM، HEX و Texas red برای کنترل مثبت L.major Positive Control بین ۲۰ تا ۳۰ می‌باشد. همچنین مقادیر Ct هر دو کانال HEX و Texas red برای کنترل مثبت L.tropica Positive Control بین ۲۰ تا ۳۰ می‌باشد.
- ✓ 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 ژنومی 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 کمتر از ۳۵ برای نمونه‌ی NTC پیشنهاد می‌شود تا آزمایشات تکرار شوند.

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

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