



دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

Toxoplasma gondii

با روش Real-Time PCR

Senmurv Toxoplasma gondii PCR kit

STEM
CELL
TECHNOLOGY
شرکت فناوری بن یاخته

Doc. #: IFU-TG-01 Doc. Version: 00 Revision Date: 12-26-2022

۳.....	شماره رفرانس
۳.....	شرح کیت
۳.....	اصول
۳.....	اطلاعات پاتوژن
۴.....	محتویات کیت
۴.....	نگهداری و انتقال کیت
۵.....	نکات احتیاط عمومی
۶.....	هشدارها و محدودیت‌ها
۷.....	عوامل تداخلی
۸.....	کنترل داخلی (Internal Control)
۹.....	آماده سازی
۱۰.....	برنامه دمایی
۱۲.....	آنالیزنتایج Rotor-Gene
۱۴.....	نشانه ها
۱۴.....	اطلاعات تماس

- BONTG-24
- BONTG-96

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) به صورت Real-Time ساخته شده است. این محصول برای تشخیص توکسوپلازما گوندی در شرایط آزمایشگاهی تهیه شده است. نتایج تشخیصی به دست آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم آن می باشد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق فلوروسنت شناسایی می شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می سازد.

اطلاعات پاتوژن

توکسوپلازما گوندی (*Toxoplasma gondii*) یک انگل اجباری درون سلولی است که قدرت آلوده کردن انواع مهره داران را دارد و عامل بیماری مشترک بین انسان و دام است. این عفونت در سراسر جهان رایج است و حدود ۳۰ درصد جمعیت انسانی به این انگل مبتلا هستند. این انگل باعث عفونت توکسوپلازما می شود. عفونت توکسوپلازما باعث بیماری کوریورتنیت و آسیب های مادرزادی مانند اختلالات مغزی، میکروسفالی و اختلالات سبزر می شود. در افراد با ضعف سیستم ایمنی، مانند مبتلایان به ایدز، تحت شیمی درمانی و یا دریافت کننده پیوند عضو، عفونت توکسوپلازما می تواند فعال شود و علائم و نشانه های شدیدتر عفونت از جمله سردرد، گیجی، عدم تعادل و تشنج، مشکلات ریوی که ممکن است شبیه سل یا ذات الریه باشد، تاری دید ناشی از التهاب شدید شبکیه چشم در نوزادان ایجاد شود.

آلودگی به توکسوپلازما گوندی در خانم‌های باردار بسیار اهمیت دارد زیرا که می‌تواند باعث عقب ماندگی جنین، مرده زایی یا سقط جنین شود و نوزادانی که در اثر ابتلای مادر به این انگل زنده می‌مانند احتمالاً با مشکلات جدی مانند، تشنج، بزرگ شدن کبد و طحال، زردی پوست و یرقان و عفونت شدید چشم روبرو هستند. فقط تعداد کمی از نوزادانی که توکسوپلاسموز دارند، علائم بیماری را از بدو تولد نشان می‌دهند و اکثر نوزادانی که آلوده هستند تا نوجوانی یا سنین بالاتر علائمی ندارند، اما ممکن است دچار کاهش شنوایی، ناتوانی ذهنی یا عفونت‌های جدی چشم باشند.

محتویات کیت

Title	24 Tests	96 Tests
	Volume per Vial	Volume per Vial
TG Master	360 µl/tube × 1	720 µl/tube × 2
Positive Control	150 µl/tube × 1	300 µl/tube × 1
Internal Control	250 µl/tube × 1	500 µl/tube × 1

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه‌جایی کیت از یونولیت با درب و یخ‌خشک استفاده نمایید.
- ✓ از نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بیشتر از یک ساعت جدا خودداری نمایید.
- ✓ این کیت نیاز به حمل بر روی بسته‌های یخ‌زده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و در نتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
- ✓ از قراردادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.

✓ معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به طور مختصر اسپین نمایید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.

مواد و تجهیزات مورد نیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود:

۱. کیت استخراج DNA از نمونه
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوک سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزی
۴. بلوک خنک کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. دستگاه با قابلیت خوانش در کانال‌های فلوروسنت مخصوص *Cycling Green, Cycling Orange*
۸. نرم‌افزار دستگاه مورد استفاده
۹. استریپ و کپ مناسب دستگاه مورد استفاده

نکات احتیاط عمومی

۱. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و درحین کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.
- ✓ لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آن‌ها جلو ببرید.
- ✓ از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضاء استفاده نکنید.
- ✓ در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
۲. از سرسمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده کنید.
۳. نگهداری و تخلیص نمونه‌های گرفته شده، باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده سازی مسترمیکس صورت پذیرد.
۴. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.

۵. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به خوبی پیپتاژ نمایید و به‌طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به‌طور کامل توصیه می‌شود.
۶. تمام مراحل مربوط به تهیه مسترمیکس باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به مسترمیکس بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.
۷. هنگام کار با مواد شیمیائی، رپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یکبار مصرف، و عینک‌های محافظ داشته باشید.
۸. کیت حاوی کنترل مثبت است. برای جلوگیری از آلودگی که ممکن است باعث ایجاد مثبت کاذب شود، کنترل مثبت را از سایر مواد موجود در کیت کاملاً جدا کنید.
۹. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
۱۰. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
۱۱. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتردار برای جلوگیری از ورود آلودگی RNA و DNA استفاده کنید.
۱۲. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یکبارمصرف بسته‌بندی کرده و به درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR را پس از تکثیر باز نکنید.
۱۳. از استفاده ی مجدد مواد یکبار مصرف پرهیزید.
۱۴. مواد موجود در کیت که بلا استفاده شده اند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱۵. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ تمیز کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP^۱ توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)^۲ انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود

^۱ Good Laboratory Practice

^۲ Personal Protective Equipment

کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 (مطابق دستورالعمل: Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated) انجام شود.

۲. پیشنهاد می شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همینطور بعد از کار لامپ UV زده شود.
۳. پیشنهاد می شود آماده سازی مخلوط واکنش از فضای اضافه کردن نمونه و کنترل مثبت جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید.
۴. پس از آماده سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

کنترل ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک حاصل از استخراج DNA استفاده شود.
۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
۳. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نگهداری نمونه های گرفته شده

نمونه می تواند کمتر از ۸ ساعت در یخچال با محدوده دما از ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و برای نگهداری طولانی مدت آن، باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد منجمد شده و نگهداری شود.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

عوامل تداخلی

EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه های سیلیس (1µl)، خون (1µl)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر) و بافر لیز عملکرد آزمایش را مهار می کنند. وجود مهارکننده در واکنش باژن کنترل داخلی قابل ردیابی است.

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسید نوکلئیک باید توسط کیت‌های استخراج DNA موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود. مواد نمونه باید از سلول‌های جدا شده از نمونه‌های بافت یا سواب استخراج شده باشد. کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

کنترل داخلی (Internal Control)

این کیت به همراه یک کنترل داخلی برای مصرف کننده تهیه شده است. این امر به کاربر اجازه می‌دهد تا هم فرآیند تخلیص را چک کند و هم احتمال وجود مواد مهار کننده PCR را بررسی نماید. به جهت کنترل فرآیند استخراج در این حالت کنترل داخلی موجود در کیت را به مقدار $0.2 \mu\text{l}$ به ازاء هر $1 \mu\text{l}$ از حجم حلال نهایی نوکلئیک اسید اضافه می‌شود. برای مثال اگر نوکلئیک اسید تخلیص شده را در $50 \mu\text{l}$ آب حل می‌کنیم باید در هنگام تخلیص نمونه به آن $10 \mu\text{l}$ کنترل داخلی اضافه کنیم. به بیان دیگر حجم کنترل داخلی اضافه شده تنها تابعی از میزان الوشن (elution) نهایی می‌باشد. این کنترل داخلی را می‌توان به طور مستقیم به بافر لیز اضافه کرد و یا آن را به مخلوط بافر لیز و نمونه اضافه نمود. این نکته قابل ذکر است که اضافه کردن کنترل داخلی به بافر لیز یا مخلوط بافر لیز و نمونه باید به صورت تازه صورت گیرد. همچنین کنترل داخلی به هیچ عنوان نباید به خود نمونه به صورت مستقیم و در غیاب بافر لیز اضافه شود. همچنین می‌توان کنترل داخلی را تنها در طی مرحله PCR اضافه کرد که در این حالت هیچ گونه کنترل بر روی مرحله تخلیص وجود نخواهد داشت. برای این منظور $1 \mu\text{l}$ از کنترل داخلی به $15 \mu\text{l}$ از master mix اضافه شده و سپس مقدار $15 \mu\text{l}$ از این مخلوط با $10 \mu\text{l}$ از نمونه تخلیص شده مخلوط می‌گردد. در صورت موفق بودن PCR، کنترل داخلی در $CT < 34$ در کانال نارنجی سیگنال می‌دهد.

آماده‌سازی

۱. ابتدا لوله‌ها را روی رک یخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و لوله‌های بافر واکنش، پرایمر پروب و کنترل مثبت را به آرامی پیپتاژ و سپس اسپین کنید. جهت آماده سازی نمونه‌ها طبق جدول زیر اقدام نمایید (جدول ۱).

جدول نحوه آماده سازی واکنش بدون IC	
TG Master	15 μ l
Total Volume	15 μ l

جدول ۱. آماده سازی واکنش بدون IC

۲. چنانچه **کنترل داخلی** را در حین استخراج وارد کرده اید، به هر لوله مستقیماً ۱۵ میکرولیتر از TG Master Mix به لوله‌های PCR اضافه کنید. چنانچه کنترل داخلی را در زمان PCR می خواهید به مسترمیکس اضافه کنید، **1 μ l** از کنترل داخلی را به **15 μ l** از مسترمیکس اضافه کنید و سپس **مقدار 15 μ l** از این مخلوط را به لوله‌های PCR اضافه کنید (جدول ۲).

جدول نحوه آماده سازی واکنش با IC	
TG Master	15 μ l
IC Control	1 μ l
Total Volume	15 μ l

جدول ۲. آماده سازی واکنش با IC

۳. مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه اسید نوکلئیک استخراج شده یا ۵ میکرولیتر کنترل مثبت را به لوله‌های PCR جداگانه اضافه کرده و با پیپتینگ مخلوط کنید. در حین تهیه PCR لازم است همه اجزا در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. از مواد بالینی منفی می‌توان به عنوان کنترل جداسازی منفی استفاده کرد (جدول ۳).

Title	Volume
Master mix	15 μ l
Sample/PTC/NTC	5 μ l
Total Volume	20 μ l

جدول ۳. آماده سازی واکنش

۴. لوله‌ها را ببندید، آنها را داخل دستگاه قرار دهید و اجازه دهید مطابق مشخصات برنامه قید شده در این دفترچه تکثیر شوند. هنگام استفاده از کنترل مثبت یا مواد بالینی بسیار مراقب باشید.

۵. در این مرحله، بهتر است از فضاهای جداگانه برای اضافه کردن مستر واکنش و نمونه‌های بیمار استفاده کرد و همچنین در نظر داشته باشید که در ویال کنترل مثبت را تنها در زیر هود آلوده باز کنید.

نکته: در هر بار انجام تست یک لوله به عنوان (NTC) No Template Control باید گذاشته شود. در NTC به جای نمونه استخراج شده از آب استفاده می‌شود که برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.

برنامه دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های Real-Time PCR دارای دو کانال Green و Orange شده است. پس از تنظیم کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. در صورت استفاده از دستگاه ABI StepOne گزینه رنگ‌رفرنس داخلی (Passive Reference) را حذف کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه Rotor Gene به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول ۴ بعد آورده شده است.

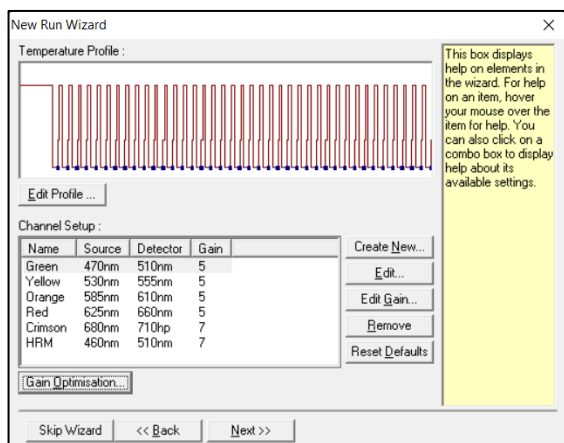
Title	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	4 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green and Texas RED	58 °C	60 sec	

جدول ۴. مقادیر دمایی

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها

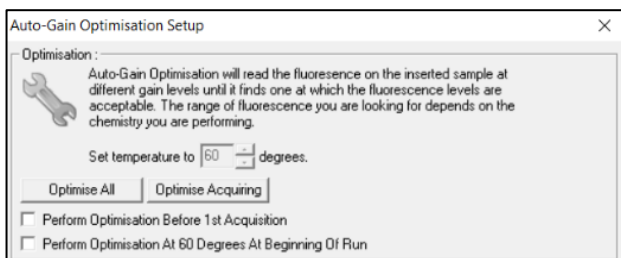
دستگاه Rotor-Gene

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱).



شکل ۱. تنظیمات دستگاه

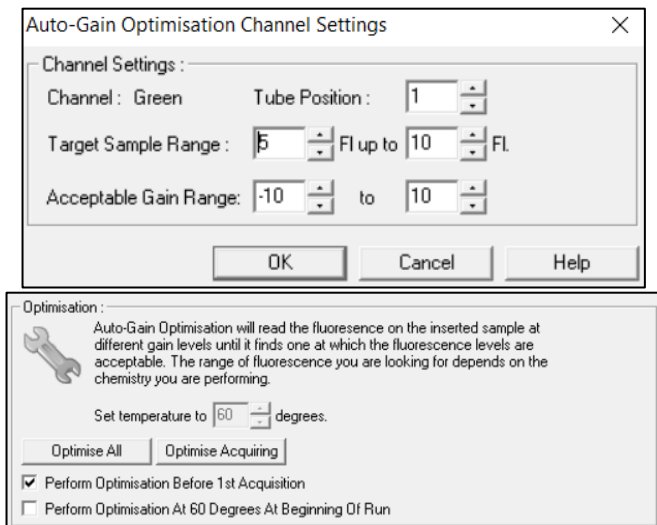
در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای هر دو کانال سبز و نارنجی بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



شکل ۲. تنظیمات دستگاه

همچنین Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب اول انجام شود

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی **Perform Optimization Before 1st Acquisition** را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۳).



شکل ۳. تنظیمات دستگاه

آنالیز نتایج Rotor-Gene

۱. آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در هر کانال رنگی، آستانه را در بازه‌ی 0.02 قرار دهید.

۲. از پنجره **Quantitation Analysis** گزینه‌ی **Slope Correct** را انتخاب نمایید.

در مرحله بعد از قسمت آنالیز باید نتایج را به صورت زیر تفسیر کرد (جدول ۵):

۱. سیگنال فلورسانس در کانال های **Green** کاملاً مشخص است. نتیجه تست **TG** مثبت است و نمونه تخلیص شده از نمونه، حاوی **TG** بوده است.

۲. هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال های Green مشاهده نمی شود. در همین حین سیگنال در کانال نارنجی مربوط به کنترل داخلی دارای منحنی سیگموئیدی و CT بین ۲۸ تا ۳۴ می باشد. در این حالت نمونه منفی در نظر گرفته می شود.









۳. هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال Green و Orange قابل مشاهده نیست. در این حالت هیچ گونه نتیجه گیری در مورد تست نمی توان انجام داد. تست باید دوباره تکرار شود.

Green (TG)	Orange(IC)	Result
+	+/-	TG -Positive
-	+	TG -Negative
-	-	Invalid

جدول ۵. آنالیز نتایج

حساسیت آنالیتیکال

برای تعیین حساسیت تحلیلی کیت Senmurv TG PCR ، یک سری رقت استاندارد از ۱۰ تا ۰٫۱ معادل ژنوم بر میکرولیتر تنظیم شد و روی Rotor-Gene Q تجزیه و تحلیل شد. ژن TG در ترکیب با کیت Senmurv TG PCR در ۳ روز مختلف و در ۸ تکرار آزمایش انجام شد. نتایج با تجزیه و تحلیل پروبیت تعیین شد. حد تشخیص تحلیلی کیت Senmurv TG PCR در دستگاه Rotor-Gene Q به میزان 1 Copy/μl می باشد؛ بدین صورت که به احتمال ۹۵٪ لود پاتوژن 5 Copy/reaction در هر تست شناسایی می گردد.

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temperature Limitation	محدودیت دمایی
	Conculta Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficient for <n> tets	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته - گروه سین مورو

دفتر مرکزی: تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد، خیابان حیدر نیا
(دوم شرقی)، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی: ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ تلفن: ۲۲۰۸۲۱۲۰ پشتیبان فنی: ۰۹۳۰۱۸۲۱۶۰۱

تلفن های تماس: ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Web Site: www.Senmurv.co

Email: info@senmurv.ir