ROJETECHNOLOGIES

Viga MTB Molecular Diagnostic Kit

Qualitative Real Time-PCR Assay

کیت تشخیص مولکولی MTB به روش Qualitative Real Time-PCR

برای استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی

محتویات Viga MTB Molecular Diagnostic Kit

اجزاء کیت	۲۵ واکنش	۱۰۰ واکنش
Pro MTB Mix	۲۵۰µl	۱۰۰۰µl
Q-ROMAX, 4X	۱۲۵µl	۵۰۰µl
MTB Positive Control	۴۰µl	۱۵۰µl
RT-PCR Grade Water	۴۰µl	۱۵۰µl

شرایط نگهداری

شرایط ارسال توسط روژه تکنولوژی چک می‌شود. پس از دریافت محصول، همه بافرها را در دمای محیط و در جای خشک نگهداری کنید. بعد از تحویل محصول همه بافرها باید در تاریکی و در دمای ۲۵- تا ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. هنگامی که شرایط نگهداری را رعایت کنید کیت تا پایان تاریخ انقضاء ذکر شده روی لیبل جعبه کیت پایدار می‌باشد.

موارد مصرف

Viga MTB molecular diagnostic Kit Real Time-PCR Kit، جهت تست تشخیص مولکولی DNA مایکوباکتریم توبرکلوزیس (MTB)در نمونه‌های انسانی مانند خلط، لاواژ برانکو آلوئولار، ترشحات بینی یا مجاری بزاقی، مایع مغزی- نخاعی، مایع مفصلی و ادرار از طریق Real Time-PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد.

گارانتی

روژه تکنولوژی کارایی تمام اجزای کیت را گارانتی می‌کند. برای اطلاع بیشتر در انتخاب محصول براساس نیازتان با متخصصین پشتیبانی روژه تماس حاصل فرمایید. چنانچه هر محصولی رضایت شما را جلب نکرد، اگر به دلیل استفاده نادرست از کیت نباشد و مشکل از روند تولید محصول باشد، تیم روژه محصول را برای شما جایگزین می‌کند.

قابل توجه خریدار محترم

این محصول فقط برای مصارف آزمایشگاهی است و برای مصارف تجاری توصیه نمی‌شود و حق فروش این کیت و سایر اجزای آن را ندارید. برای اطلاعات بیشتر در مورد مجوز فروش یا توزیع با تیم فروش روژه تماس حاصل فرمایید.

هشدارها و اقدامات احتیاطی

- توجه کنید که حتما محصول توسط افراد متخصص در آزمایشگاه به کار گرفته شود.
- قبل از اولین استفاده، محصول و اجزای آن را از نظر تعداد و حجم بررسی کنید. از محصول معیوب یا ناقص استفاده نکنید، عملکرد آن ممکن است تحت تاثیر قرار گیرد.
- اکیدا توجه شود هنگام کار با نمونه‌های مثبت یا نمونه‌های گرفته شده از بیماران، احتمال سرایت بیماری وجود دارد.

- از خوردن، آشامیدن، سیگارکشیدن، جویدن ادامس، استفاده از وسایل آرایشی و استفاده از داروها در آزمایشگاه‌ها که محل کار با مواد خطرناک و نمونه‌های آزمایشگاهی است اکیدا اجتناب شود. توجه کنید احتمال سرایت بیماری از نمونه‌های مثبت وجود دارد.
- کیت حاضر برای مصارف تشخیصی آزمایشگاهی و موارد اضطراری طراحی شده است.
- هر مرحله از مجموعه مراحل به کارگیری کیت شامل نمونه برداری، ذخیره‌سازی، انتقال نمونه‌ها و انجام تست‌های آزمایشگاهی باید طبق دستورالعمل‌های موجود برای کار با ترکیبات مولکولی مطابق باشد.
- برای انجام تست مناطق کاری جداگانه و مخصوص در آزمایشگاه در نظر بگیرید.
  - محل ۱- محل آماده‌سازی: آماده‌سازی ترکیبات تست
  - محل ۲-آماده‌سازی نمونه: جداسازی و کنترل تست
  - محل ۳- محل تکثیر DNA در محل Real Time-PCR
- دقت شود آزمایشگاه تشخیصی باید توسط دستگاه‌ها و ابزارهایی تجهیز شده باشند که طبق دستورالعمل‌های وزارت بهداشت کار می‌کنند.
- همه محتویات کیت برای تست MTB طراحی شده است، لذا از جابجا کردن یا جایگزین کردن بافرها با سایرکیت‌ها خودداری کنید زیرا عملکرد کیت تغییر می‌کند و برخلاف مقررات استفاده از کیت می‌باشد.
- همه سمپلرها و سرسمپلرها باید عاری از DNase و RNase باشند. برای جلوگیری از آلودگی، ازسرسمپلر فیلتر دار استفاده کنید و بعد از هر بار استفاده آن را تعویض کنید.
- زباله‌های زیستی و خطرناک را مطابق با قوانین محلی و بین المللی دفع کنید تا از آلودگی محیط زیست اجتناب شود. همه سطوح کار و دستگاه‌های آزمایشگاهی باید با اتانول ۷۰ درصد یا سدیم هیپوکلرایت ۱۰ درصد (وایتکس) استریل شوند.
- از در معرض قرار دادن ترکیبات کیت در نور مستقیم افتاب خودداری کنید.

کنترل کیفیت

محصول Viga MTB Molecular Diagnostic Kit توسط آزمایش‌های مشخص از پیش تعیین شده برای هر سری ساخت، مطابق با استانداردهای WHO و Clinical an Laboratory Standards Institute مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. برای اطلاع بیشتر از نتایج آزمایش‌ها می توانید از طریق سایت روزه و با استفاده از REF و Lot Number کیت خریداری شده درخواست Certificate of Analysis خود را ثبت کنید تا برای شما ارسال گردد.

وسایلی که باید توسط کاربر تامین گردد

- میکروتیوب‌های عاری از DNase و RNase (۱/۵ میکرولیتر)
- میکروتیوب‌های PCR شامل استریپ ۰/۵ میلی‌لیتر یا ۰/۲ میلی‌لیتر
- دستکش بدون پودر (یکبار مصرف) و گان جراحی
- انواع مختلف سمپلر و سرسمپلر (سرسمپلرهای ۱۰میکرولیتر، ۱۰۰میکرولیتر و ۱۰۰۰ میکرولیتر)
- ترکیبات ضدعفونی‌کننده مخصوص سطوح مانند RNZO قابل سفارش از شرکت روزه تکنولوژی (Cat No: RN983048)
- ورتکس
- سانتریفیوژ (تا ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه)

- میکروسانتریفیوژ
- بلوک خنک کننده
- دستگاه‌های Real Time-PCR

شرح محصول

بیماری سل یک بیماری مسری تنفسی مایکوباکتریال است که توسط M.tuberculosis complex (شامل: M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis, M. bovis BCG, M. microti, M. pinnipedii) ایجاد می‌شود. MTB از طریق قطرات ریز تنفسی که با سرفه و عطسه پراکنده شده‌اند، از فردی به فرد دیگر منتقل می‌شود. تشخیص سل در مراحل اولیه هم برای درمان شخص بیمار و هم برای جلوگیری از انتقال ویروس اساسی است. کیت تشخیصی Viga MTB molecular diagnostic kit مبتنی بر واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز Real Time-PCR عمل می‌کند. این کیت برای تشخیص کیفی ژن IS6110(specific multi-copy insertion sequence) طراحی شده است. بعد از جداسازی DNA توسط کیت DNJia Tissue and Bacteria Kit یا سایر کیت‌های مورد تایید وزارت بهداشت، ترکیب نمونه مورد تایید می‌تواند به محلول مستر میکس و پرایمر/پروب اضافه شود تا واکنش انجام شود. کنترل داخلی (IC) برای جلوگیری از نتایج کاذب منفی، کیفیت نمونه و نمونه‌گیری و پروسه اجرایی تست توسط PCR کنترل و بررسی می‌شود. نتایج نشان دادند که LoD (کمترین حد تشخیص) برابر با ۲۵ کپی در هر میلی‌لیتر است.

کاربرد

Viga MTB Molecular Diagnostic Kit یک کیت تشخیص مولکولی برای تشخیص همه اعضای M. tuberculosis complex (M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis, M. bovis BCG, M. microti, M. pinnipedii) در نمونه خلط و ترشحات برونشیال، مایع مغزی-نخاعی، مایع معدی یا ترشحات ناحیه صفاق یا BAL است. این امر مبتنی بر فناوری Real Time-PCR می‌باشد که برای تکثیر ژنوم MTBC از پرایمرهای خاص و پروب‌های خاص دارای برچسب فلورسنت استفاده می‌شود.

ویژگی‌ها

تکنولوژی	Real Time-PCR
نوع تجزیه و تحلیل	Qualitative
توالی هدف	ژن IS6110 (specific multi-copy insertion sequence)
ویژگی آنالیتیکال	Mycobacterium tuberculosis complex (M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti, M. caprae, M. canetti and vaccine strain BCG), 100%
حساسیت آنالیتیکال (LOD)	LoD تست ۲۵ کپی بر میلی‌لیتر با احتمال ۹۵٪ است.
ویژگی تشخیصی	100% (CI95%: 99.06% –100%)
حساسیت تشخیصی	100% (CI95%: 99.06 %–100%)
Metrological Traceability	
قابلیت کنترل آلودگی PCR و کنترل بازده استخراج DNA	PCR inhibition and DNA extraction efficiency control
نمونه مورد استفاده	نمونه خلط، BLA، ترشحات برونشی، مایع مغزی- نخاعی، مایع معدی یا ناحیه صفاق

شرایط نگهداری	۲۰- تا ۱۵- درجه سانتیگراد
روش استخراج پیشنهادی	DNJia Tissue and Bacteria Kit
دستگاه‌های پیشنهادی	Rotor-Gene Q, 2plex, Corbett Rotor-Gene 3000 & 6000, Mic qPCR Cycler, StepOne and StepOne plus Applied Biosystem
کانال‌های تشخیصی مورد نیاز	Green-Yellow

بیماری‌زایی

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک گونه از باکتری‌های بیماری‌زا در خانواده مایکوباکتریا و مسئول ایجاد بیماری سل می‌باشد. اولین بار در سال ۱۸۸۲ توسط روبرت کخ کشف شد. طبق آخرین گزارشات منتشر شده در سال ۲۰۱۹ که توسط سازمان جهانی بهداشت ویرایش گردیده است، TB به عنوان دهمین عامل مرگ در سراسر جهان و اولین عامل مرگ تک عاملی مسری با بیشترین نرخ سرایت و مرگ در کشورهای درحال توسعه و کم برخوردار اعلام گردیده است. بیماری سل انسانی معمولا با فروبردن ذرات تنفسی حاوی باسیل توبرکلوزیس که مستقیما از ریه فرد دارای بیماری ریوی فعال خارج شده است، ایجاد می‌گردد. در مسری بودن برای هر شخص ۱ تا ۲۰۰ باسیل است، اما هر ذره تنفسی می‌تواند شامل هر مقدار از ۱ تا ۴۰۰ باسیل باشد ولی در بیولژیکی مربوطه کاملا مشخص نیست. باسیل ابتدا به کیسه‌های هوایی جایی که توسط ماکروفاژ ها فاگوسیتوز می‌شود منتقل می‌شود. بیماری زایی MTB کاملا وابسته به توانایی باسیل برای تغییر برنامه ماکروفاژ میزبان بعد از اولین سرایت است به طوریکه مانع از حذف شدن خود از طریق شکل‌گیری گرانولاهایی می‌شود که سبب زنده ماندن عامل بیماری در تطابق با دفاع سلول میزبان و کم کردن کنترل سلول میزبان بر مرکز متابولیسم و تکثیر باکتری می‌شود. این شرایط در اصلاح دوره کمون بیماری نامیده می‌شود که MTB نسبت به دفاع میزبان و حتی درمان مقاوم می‌گردد.

اقدامات پیشنهادی کار با مواد قبل از شروع واکنش

- قبل از شروع مراحل کار، لطفا همه دستورالعمل‌های ایمنی کار با MTB را مطالعه کنید.
- قبل از شروع هرگونه تست، هرکدام از ترکیبات کیت باید توب، ورتکس و سانتریفیوژ شوند. از توب و فریز مکرر نمونه‌ها بپرهیزید.

جمع آوری و آماده سازی نمونه

نمونه‌های انسانی شامل خلط، BLA(bronchoalveolar lavage)، ترشحات برونشی، مایع مغزی-نخاعی، مایعات معدی یا ناحیه شکم می‌باشد. نمونه‌های تازه یا باید سریعا طبق روش کیت DNJia Plus Tissue and Bacteria Kit تخلیص شده یا در ۲۰°C- نگهداری شود. نمونه‌های یخ زده را قبل از شروع کار به دمای اتاق برسانید. اقدامات لازم را برای آلودگی‌زدایی نمونه و آمادسازی آن برای استخراج DNA انجام دهید.

قبل از شروع کار

- ترکیبات کیت را خارج کنید و برروی میز کار قرار دهید.
- اجازه دهید بافرها به دمای محیط برسند و سپس به صورت مختصر هر تیوب را برای استفاده بعدی ورتکس کنید.

آماده سازی بافرها

جدول ۱: آمادهسازی اجزای واکنش به ازای یک واکنش

اجزاء مورد نیاز	حجم
Pro MTB Mix	۱۰µl
Q-ROMAX, 4X	۵µl
Isolated DNA	۵µl

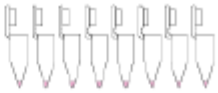
آماده سازی محیط کار

تمامي سطوح كاري، سمپلرها، سانتريفيوژها و ساير ملزومات قبل از استفاده تميز و ضدعفوني گردد. بايد از تركيبات ضدعفوني‌كننده نظير هيپوكلريت سديم ۱۰٪، اتانول۷۰٪ و يا RNZO (Cat NO:RN983048) جهت كاهش خطر آلودگي با اسيدنوكلئيک استفاده كرد.

پروتکل

همه بافرها را به طور کامل ذوب کرده و به دمای اتاق برسانید (۱۵-۲۰ °c). بعد از ذوب، همه بافرها را توسط پیپت کردن مداوم و ورتکس، مخلوط و سپس به صورت مختصر سانتریفیوژ کنید. سریع کار کنید و همه بافرها را در بلوک یخ قرار دهید. حجم کلی DNA در این تست باید ۵µl باشد. واکنش PCR را آماده سازی و سپس با Real Time-PCR اجرایی کنید.

Step 1:
Equilibrate Q-Romax, 4X
and Pro MTB -Mix to room temperature



Step 2:
Add 5µl Q-Romax, 4X in to clean microtube

Step 3:
Add 10µl Pro MTB Mix to the previous tube

Step 4:
Mix all reagents

Step 5:
Pulse Vortex the mixture

Step 6:
Centrifuge briefly

Step 7:
Add 5µl isolated DNA

Step 8:
Run the PCR program

Step 9:
Result interpretation

MTB (FAM)	IC (HEX)	Results
Ct ≤40 (+)	Not considered	Positive control*
-	Ct>35(+)	Negative control*
-	-	Invalid and not accepted

شکل۱: مراحل آماده‌سازی بافرها و اجرای برنامه PCR و تفسیر نتایج حاصل.

جدول ۲: آماده‌سازی واکنش PCR

اجزاء مورد نیاز	حجم
Pro MTB Mix	۱۰µl
Q-ROMAX, 4X	۵µl
DNA تخلیص شده	۵µl

برنامه دمایی Real Time-PCR

جدول ۳: برنامه دمایی هر قسمت در جدول زیر آورده شده است.

تعداد سیکل	دما	زمان	مرحله
۱	۹۵°C	۳ دقیقه	**پیش از واسرشتگی**
۴۵ سیکل	۹۵°C	۱۰ ثانیه	**واسرشته شدن**
	۶۰°C	۴۰ ثانیه	**اتصال و تکثیر اسیدنوکلئیک و اندازه میزان فلورسانس در کانال‌های سبز و زرد**

تفسیر نتایج

- آنالیز اطلاعات برای هرژن باید به صورت جداگانه و باید با استفاده اطلاعات استاندارد مختص مربوطه انجام شود.
- حد آستانه برای هر نمونه باید در فاز نمایی خود در نمودار فلوئورسانس و بالای نمودار هرنوع سیگنال پس زمینه باشد.
- فلوئوفور FAM (سبز) برای ژن IS6110 مایکوباکتریم توبرکلوزیس و HEX (زرد) برای ژن IC در نظر گرفته شده است.
- کنترل منفی برای کنترل آلودگی تست می‌باشد. افزایش بزرگی نمودار فلوئورسنس در کنترل منفی با حد آستانه تداخل پیدا نمی‌کند. اگر Ct کمتر از ۳۵ باشد (Ct<35) به عنوان آلودگی در نظر گرفته می‌شود. سیگنال‌های قوی بالای ۳۵ در NTC می‌تواند مربوط به آلودگی‌های PCR باشد که در این موارد شکل نمودار PCR مهم است (نمودار S شکل، شکل رایج نمودار نتایج مثبت است).
- کنترل داخلی باید برای همه نمونه‌های بالینی در Ct ۳۵ یا کمتر از ۳۵ مثبت شود که نشان‌دهنده تعداد کافی از کپی نوکلئیک اسید از ژن انسانی و کیفیت خوب نمونه است.

- نمودار کنترل داخلی Ct> ۳۳ با بدون Ct نشان‌دهنده مقدار کم نمونه یا بازدارنده‌ها در واکنش است (پیشنهاد می‌شود سمپل جداشده تا حداقل ½ رقیق شود). اگر نتایج تست حتی بعد از اجرای برنامه PCR قابل قبول نبود، نمونه جدید دیگری باید از بیمار گرفته و تست مجددا تکرار شود.
- یک نمونه مثبت بالینی باید۴۰ ≥Ct برای ژن هدف داشته باشد (IS6110) .
- اگر واکنش مثبت مورد انتظار قابل دستیابی نبود (نمودار معمول S شکل)، تست انجام شده غیرقابل قبول است و تست باید طبق دستورالعمل‌های کیت تکرار شود.
- دلیل ناکارآمدی کنترل مثبت را بررسی کنید و بعد از تصحیح عیب، آن را ثبت کنید.

جدول ۴: شرایط نمونه‌های کنترل برای یک ران PCR قابل قبول

نتایج	IC (HEX)	MTB (FAM)
*کنترل مثبت	در نظر گرفته نشده	**Ct≤40 (+)**
کنترل منفی	Ct>35 (+)	-
نامعتبر و غیر قابل پذیرش	-	-

محدودیت‌های تست

- نتیجه کاذب منفی در موارد تیتر پایین MTB در نمونه گرفته شده از بیمار، شرایط نامناسب انتقال و کیفیت پایین جداسازی نمونه به دست می‌آید.
- همه کنترل‌ها قبل از تفسیر باید بررسی شوند. محدودیت بالینی برای این کیت ۴۰ ≥Ct می‌باشد و همچنین کاربر می‌بایست نمودار فلوئورسنس را قبل از تفسیر نهایی بررسی کند. همه نمودارهای مثبت باید یک پیک تکثیر داشته باشند.
- نگهداری از کیت در شرایط نامناسب منجر به نتیجه منفی کاذب می‌گردد.
- استفاده از این کیت نیاز به پرسنل با تجربه و کارآمد دارد. هر نوع خطای پرسنل ممکن است منجر به نتایج نامعتبر شود.
- نتایج مربوط به این کیت تشخیصی فقط در صورتی قابل قبول است که همراه با شواهد بالینی برای تشخیص MTB باشد.
- تشخیص و درمان قطعی برای بیماران باید براساس ترکیب نتایج این تست و سایر تست‌ها، سوابق پزشکی بیمار و نحوه پاسخ به درمان تعیین گردد.

آزمایش‌های ارزیابی و معتبرسازی
آماده‌سازی نمونه استاندارد

استخراج DNA از نمونه شخص مبتلا به MTB (۱۰۰۰۰ کپی در هر میلی‌لیتر) صورت گرفت. از همین نمونه غلظت‌های ۱۰۰۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰ کپی بر میلی‌لیتر تهیه شد و تست توسط کیت Artus M. tuberculosis RG PCR Kit (Qiagen) با متوسط ۱۰ بار تکرار برای هر غلظت توسط دستگاه Real Time-PCR (Rotor-Gene Q-Qiagen) صورت گرفت.

کمترین حد تشخیص – حساسیت آنالیتیکال

از مطالعات LoD برای تعیین کمترین غلظت قابل تشخیص ژنوم MTB استفاده شد، که در آن تقریباً ۹۵٪ از کل نمونه‌ها (مثبت واقعی) نتیجه مثبت را تکرار کردند. برای تعیین حساسیت آنالیتیکی کیت Viga MTB molecular diagnostic kit با افزودن پلازمید و تهیه غلظت‌های استاندارد از ۱۲/۵ تا ۵۰ کپی بر میلی‌لیتر در نمونه بالینی انجام شد. LoD هر تست سپس با ۲۰ بار تکرار برای رقت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ کپی بر میلی‌لیتر در محدوده آزمایشی تعیین شده انجام گرفت. کمترین حد تشخیص یا LoD نهایی، کمترین غلظت از رقت‌های تهیه شده با تعداد ۱۹ بار جواب مثبت از هر ۲۰ تکرار باشد. از نمونه‌های تهیه شده ۲۰ تکرار از هر رقت گذاشته شد و نتایج زیر بدست آمد. LoD کیت Viga MTB molecular diagnostic kit توسط کیت DNJia Tissue and Bacteria Kit تعیین شد. این مقدار برای کیت حاضر ۲۵ کپی بر میلی‌لیتر بدست آمد.

جدول۵: نتایج بررسی کیت Viga MTB molecular diagnostic kit بر اساس کیت تخلیص DNJia Tissue and Bacteria Kit

Test No	(Copies/mL)		
	MTB		
	50	25	12.5
1	35.17	35.28	36.50
2	34.30	35.06	36.57
3	33.61	37.35	35.49
4	35.02	37.49	Undetermined
5	34.49	36.13	Undetermined
6	34.07	36.02	Undetermined
7	34.41	35.49	37.04
8	34.37	36.60	Undetermined
9	34.53	35.42	38.58
10	34.89	35.61	37.53

11	35.06	37.62	Undetermined
12	34.36	36.46	38.91
13	34.28	38.48	36.28
14	33.92	36.66	37.60
15	34.76	36.15	Undetermined
16	34.76	35.91	Undetermined
17	35.72	37.46	Undetermined
18	38.22	35.19	37.41
19	34.04	38.06	38.65
20	36.19	36.25	Undetermined
Positive percentage in each concentration	100%	100%	55%

اختصاصیت آنالیتیکال

توالی مجموعه پرایمر/پروب مورد استفاده در کیت تشخیصی Viga MTB molecular diagnostic kit در in-silico برای توالی های MTB در سایت NCBI در تاریخ ۲۶ سپتامبر ۲۰۲۱ مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل همردیفی (Alignment) توالی های پرایمر/پروب برای توالی ژن IS6110 ۱۰۰٪ همپوشانی را با توالی‌های MTB نشان داد. نتایج هم ردیفی در جدول زیر نشان داده شده است.

جدول۶: نتایج همردیفی ژن IS6110

Strain	Target	Accession	% Homology Test Forward primer%	% Homology Test Reverse primer%	% Homology Test Probe%
Mycobacterium tuberculosis strain 2.2	IS6110	CP074075.1.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis R2092 DNA	IS6110	AP024671.1.1	100	100	100

Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv_CG	IS6110	CP072765.1.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis strain CG24	IS6110	CP072761.1.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis strain CG21	IS6110	CP072763.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis strain CG20	IS6110	CP072764.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis strain CG23	IS6110	CP072762.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis strain 267/47W148	IS6110	CP071128.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis strain 120/26CAO	IS6110	CP071127.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis strain 11502	IS6110	CP070338.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis variant microti strain Mycobacterium microti 94-2272	IS6110	LR882500.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis variant microti OV254	IS6110	LR882499.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis variant microti strain Mycobacterium microti Maus III	IS6110	LR882498.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis variant microti strain Mycobacterium microti Maus IV	IS6110	LR882497.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis variant microti strain Mycobacterium microti ATCC 35782	IS6110	LR882496.1	100	100	100
Mycobacterium orygis strain MUHC/MB/EPTB/Orygis/51145	IS6110	CP063804.1	100	100	100

Mycobacterium tuberculosis strain 1-0006P6C4	IS6110	CP041876.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis strain 2.2	IS6110	CP074075.1.1	100	100	100
Mycobacterium tuberculosis R2092 DNA	IS6110	AP024671.1.1	100	100	100

حساسیت بالینی

با استفاده از یک نمونه منفی (نمونه خلط) رقت‌های ۲۵۰، ۲۵۰۰ و ۲۵۰۰۰ کپی بر میلی‌لیتر (3log10> LOD, 2log10> LOD, 1log10> LOD) از نمونه کنترل تهیه شد، سپس نمونه‌ها تخلیص و آزمایش با استفاده از کیت تشخیصی Viga MTB molecular diagnostic kit (ROJETechnology) بصورت ده بار تکرار بررسی شد.

جدول ۷: نتایج آزمون حساسیت کلینیکال کیت تشخیصی Viga MTB molecular diagnostic kit (ROJETechnology) در جدول زیر می‌باشد.

رقت تهیه شده	غلظت نمونه	Ct
≤3log10 LOD	25,000	26.64
		27.27
		27.05
		26.63
		26.71
		26.27
		26.48
		26.59
		27.44
		26.37
≤2log10 LOD	2,500	32.84
		31.88
		33.31
		33.60
		32.78
		31.63
		32.68
		32.17
		34.08
		32.87
≤1log10 LOD	250	36.54
		36.82
		34.62

		34.78
		35.58
		35.61
		35.44
		34.76
		35.78
		35.20

همانطور که در جدول مشـــاهده می‌شـــود نتایج بعد از اســـتخراج برای تمام نمونه‌ها از LOD <3log10 تا LOD <1log10 مثبت می‌باشد.

واکنش متقاطع (ویژگی آنالیتیکال)

این آزمایش برای کیت Viga MTB molecular diagnostic kit بصـــورت in-Silico با تجزیه و تحلیل همردیفی (Alignment) توالی‌های پرایمر/پروب برای ویروس MTB در پایگاه داده NCBI در بانک nr/nt با استفاده از نرم افزار BLASTN 2.10.0+ نشان داد که این پرایمر/پروب فقط توالی‌های ویروس MTB را شناسایی می‌کند. بر اساس این تجزیه و تحلیل هیچ واکنش متقاطع‌ایی برای سایر پاتوژن‌های بیماری‌های تنفسی در جدول زیر مشاهده نشد.

جدول ۸: نتایج in-Silico پرایمر/پروب کیت Viga MTB molecular diagnostic Kit برای ســـایر پاتوژن‌های عامل بیماری‌های تنفسی

Pathogen (Taxonomy ID)	Strain	GenBank Acc#	% Homology Test FP	% Homology Test RP	% Homology Test Probe
Human coronavirus	HCoV_OC43/Seattle/USA/SC0776/2019	MN310478.1	52	85	50
Human respiratory syncytial virus A	RSVA/Homo sapiens/USA/MCRSV_211/1980	MG642060.1	47	50	44
Human respiratory syncytial virus B	RSVB/Homo sapiens/USA/MCRSV_267/1983	MG642059.1	42	50	58
Human adenovirus	HAdV7/China/Hubei/19S0082726/2019-06-07	MW816101.1	88	75	80
Haemophilus influenzae	P602-8883	CP033168.1	72	55	50
Human Metapneumovirus (hMPV)	A/NSW/WM2014916/16	MW221986.1	47	65	44
Parainfluenza virus 1-4	HPIV3/38/ZJ/CHN/2018	MN145876.1	44	50	60

Rhinovirus	JC201/Zhuhai/GD/CHN/2013	KM613168.1	57	55	61
Chlamydia pneumoniae	LPCoLN	CP001713.1	66	60	55
Legionella pneumophila	ST42	LT632617.1	77	95	100
Streptococcus pneumoniae	2245STDY5982722	LR216031.1	57	65	72
Streptococcus pyogenes	FDAARGOS_668	CP044093.1	66	80	66
Bordetella pertussis	J029	CP046995.1	90	72	50
Mycoplasma pneumoniae	463 satellite Mpn16	MW920166.1	55	95	52
Candida albicans	TIMM 1768	CP032016.1	66	70	55
Pseudomonas aeruginosa	CF39S	CP045917.1	66	100	65
Staphylococcus epidermis	NW32	KT726221.1	57	90	55
CMV	IRNToG3	KC122248.1	55	50	55
Cryptococcus neoformans	H99 CMGC/DYRK/DYRK2	XM_012196141.1	72	65	66
human genome	AKR1C3	NG_047094.1	56	78	60

واکنش متقاطع (ویژگی بالینی)

همچنین برای بررسی ویژگی بالینی، اسید نوکلئیک پاتوژن‌ها در ماتریس نمونه منفی (نمونه خلط) با غلظت خاص رقیق شد و سپس نمونه‌ها تخلیص و آزمایش با استفاده از کیت (Viga MTB molecular diagnostic kit) بررسی شد، هیچ واکنش متقاطع برای سایر پاتوژن‌ها در جدول زیر مشاهده نشد.

جدول ۹: بررسی واکنش متقاطع ویروس MTB با کیت Viga MTB molecular diagnostic kit

Virus/Bacteria/Parasite	Source/ Sample type	Ct Value
Adenovirus	AmpliRun®DNA/RNA Vircell	-/-
Influenza A	AmpliRun®DNA/RNA Vircell	-/-
Influenza B	AmpliRun®DNA/RNA Vircell	-/-
Legionella pneumophila	AmpliRun®DNA/RNA Vircell	-/-
Cryptococcus neoformans	AmpliRun®DNA/RNA Vircell	-/-
Chlamydia pneumonia	AmpliRun®DNA/RNA Vircell	-/-
Streptococcus pneumoniae	AmpliRun®DNA/RNA Vircell	-/-
Respiratory Syncytial Virus	AmpliRun®DNA/RNA Vircell	-/-
Mycoplasma pneumoniae	AmpliRun®DNA/RNA Vircell	-/-
Streptococcus pyogenes	AmpliRun®DNA/RNA Vircell	-/-
Mycobacterium tuberculosis	AmpliRun®DNA/RNA Vircell	-/-
10 Pooled human genomes	Clinical sample	-/-

همانطور که در جدول بالا مشاهده می‌شود نمونه‌های ژنوم (RNA, DNA) از نمونه‌های بالینی تهیه شد و آزمون اختصاصیت یا ویژگی با استفاده از کیت Viga MTB molecular diagnostic kit انجام شد، که نتایج تمام آنها منفی شد که نشان‌دهنده عدم اتصال پرایمر و پروب‌های اختصاصی به میکروارگانیسم‌های دیگر می‌باشد.

دقت

ارزیابی دقت، شامل تکرار پذیری و تجدید پذیری درون آزمایشگاهی می‌باشد.

تکرارپذیری درون ران

Intra-assay (درون سنجی) به دقت و توانایی روش طراحی شده در تعیین علظت تکرارهای مشابه در یک سیکل Real Time-PCR اشاره دارد که بصورت SD برای Ct های مختلف نشان داده می‌شود. برای این منظور ۳ تکرار از هر علظت استاندارد در یک واکنش کاری مورد بررسی قرار گرفت و مقادیر ضریب تغییرات(CV) برای مقادیر سیکل آستانه (Ct)، محاسبه شد. که نتیجه واکنش برای ژن هدف (IS6110) در بیشترین مقدار ضریب تغییرات ۱/۱۷ و کمترین مقدار ضریب تغییرات ۰/۷ می‌باشد. کلیه نتایج قابل قبول باید CV کمتر از ۵٪ داشته باشند.

تجدید پذیری

Inter-assay (میان سنجی) به اختلافات موجود در نتایج بین ران‌های مختلف واکنش Real Time-PCR با نتایج حاصل از آزمایشگاه های مختلف اشاره دارد و معمولاً بصورت SD یا CV مربوط به تعداد کپی‌ها یا غلظت‌های مختلف از یک نمونه بیان می‌شود. برای این منظور واکنش Real Time-PCR برای غلظت‌های استاندارد با ۵ تکرار از هر استاندارد در سه روز مختلف انجام شد. که نتیجه واکنش در بیشترین مقدار ضریب تغییرات ۱/۷۶ و کمترین مقدار ضریب تغییرات ۱/۰۹ می‌باشد. کلیه نتایج قابل قبول باید CV کمتر از ۱۰٪ داشته باشند.

ارزیابی بالینی

عملکرد بالینی کیت Viga MTB molecular diagnostic kit با استفاده از ۱۳۰ نمونه خلط انسانی، BAL، ترشحات برونشی و مایع مغزی-نخاعی از بیمارانی که مشکوک به MTB بودند جمع‌آوری شد. برای مقایسه و بررسی صحت کیت تشخیصی (Viga MTB molecular diagnostic kit) از کیت Artus M. tuberculosis RG PCR Kit (Qiagen) استفاده شد. استخراج نوکلئیک اسید با کیت DNJia Tissue and Bacteria Kit صورت گرفت.

هر دو روش بر روی دستگاه Real Time-PCR (Rotor-Gene Q-Qiagen) اجراء شد. نتایج NPA (میزان توافق نتایج منفی) 100%و PPA (میزان توافق نتایج مثبت) 100%در جدول زیر نشان داده شده است.

جدول ۱۰: نتایج آزمایش‌های حساسیت بالینی

Test		Artus M. tuberculosis RG PCR Kit (Qiagen)		Total
		Positive	Negative	
Viga MTB molecular diagnostic kit	Positive	30	0	30
	Negative	0	100	100
Total		30	100	130

- Positive Agreement Rate: ۱۰۰/ ۱۰۰×٪۱۰۰=%۱۰۰
- Negative Agreement Rate: ۱۰۰/۱۰۰×%۱۰۰= ٪۱۰۰

نمادها

جدول ۱۱: نمادها روی لیبل کیت

معنی	نمادها	معنی	نمادها
آدرس کارخانه		دمای نگهداری	2-8 °C
تاریخ تولید		سری ساخت محصول	LOT
تاریخ انقضا		In Vitro Diagnostics	IVD
شماره کاتالوگ محصول	REF		

عیب‌یابی

در این قسمت تلاش می‌شود تا بیشتر مشکلاتی که حین کار ممکن است برای کاربر رخ دهد بررسی شود و راه حل‌های پیشنهادی برای رفع آن عنوان گردد. همچنین محققین بخش پشتیبانی روزه مشتاق هستند تا به تمام سوالات شما پاسخ دهند. در صورت احتیاج حتما با بخش پشتیبانی روزه تماس حاصل فرمایید.

مشاهدات	دلیل احتمالی	راه حل
• **منحنی کنترل منفی افزایش شدت فلورسانس را نشان دهد (یک مثبت کاذب اتفاق می‌افتد).**	• در مرحله آماده‌سازی مسترمیکس خطا رخ داده است.	• ترکیبات کیت را بررسی کنید و مطمئن شوید در مرحله آماده‌سازی مسترمیکس حجم درستی از بافرها استفاده شده است. مرحله آماده‌سازی مسترمیکس را مجددا تکرار کنید.
	• خطا در راه‌اندازی دستگاه	• مطمئن شوید برنامه‌ریزی دستگاه Real Time-PCR به درستی انجام شده است.
• **کنترل داخلی برای نمونه هیچ منحنی افزایش شدت فلورسانسی را نشان نمی‌دهد و برای نمونه منفی می‌باشد.**	• آلودگی نمونه ممکن است در مرحله آماده‌سازی یا استخراج اتفاق افتاده باشد.	• همه سطوح و دستگاه‌ها را با محلول‌های پاک کننده تمیز کنید. روپوش‌های آزمایشگاه رابشویید و تیوب‌ها و سرسمپلرهای استفاده شده را جایگزین کنید.
	• تیوب‌های PCR به درستی بسته نشده اند.	• مطمئن شوید درب تیوب‌های PCR کاملا بسته هستند.
• **سیگنال فلورسانس نمایش حالت یا شکل S را نشان نمی‌دهد.**	• ترکیبات تخریب شده‌اند.	• از ترکیبات جدید استفاده کنید.
	• کیفیت پایین نمونه‌های DNA که حاوی آلودگی است.	• دوباره آزمایش را با DNA استخراج شده تکرار کنید. • استخراج DNA را با یک کیت معتبر تکرار کنید. • DNA استخراج شده را به نسبت ۱:۲ رقیق کنید.
	• خطا در دستگاه PCR	• آزمایش را تکرار کنید یا با تامین کننده تجهیزات تماس بگیرید.

اطلاعات سفارش

گروه محصول	نام محصول	شماره کاتالوگ	تعداد واکنش
کیت‌های تشخیص مولکولی	Viga MTB Molecular Diagnostic Kit	MD003057	25 Preps
	Viga MTB Molecular Diagnostic Kit	MD003054	100 Preps