# راهنمای کیت TB RQ

**جهت تشخیص و کمیت سنجی گروه**
**مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس**
**به روش Real-Time PCR**

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-08-304
ویرایش ۳/۴
شهریور ۱۴۰۱

Novin Gene

فهرست مندرجات:


۱. مقدمه ..... ۲

۲. محتویات کیت ..... ۳

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت ..... ۳

۴. سایر موارد مورد نیاز ..... ۴

۵. نکات قابل توجه ..... ۴

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ..... ۵

۷. استخراج DNA ..... ۵

۸. کنترل داخلی ..... ۶

۹. محاسبه تیتر ..... ۷

۱۰. دستورکار PCR ..... ۸

۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ..... ۹

۱۲. تنظیم دستگاه StepOne ..... ۹

۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها ..... ۱۰

۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene ..... ۱۲

۱۵. آنالیز نتایج StepOne ..... ۱۴

۱۶. محدوده خطی ..... ۱۵

۱۷. میزان حساسیت ..... ۱۵

کیت **TB RQ** برای تشخیص و کمیت سنجی DNA باکتری های گروه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس می باشد. این کیت برای کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده و مخصوص مصارف تحقیقاتی است.

## ۱. مقدمه

بیماری عفونی توبرکولوز (Tuberculosis/TB) یکی از بزرگترین مشکلات بهداشتی دنیا است که سالانه موجب مرگ بیش از دو میلیون نفر می شود. عامل این بیماری گروهی از باکتری های درون سلولی هستند که مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس (Mycobacterium tuberculosis complex) نامیده می‌شوند. مایکوباکتریوم توبرکولوزیس(M. Tuberculosis)، مایکوباکتریوم بوویس (M. bovis) و مایکوباکتریوم بوویس ب ث ژ (M. bovis BCG) از جمله این باکتری ها هستند.

اگرچه کشت همچنان به عنوان معتبرترین روش تشخیص توبرکولوز محسوب می شود، Real-Time PCR به نحو روز افزونی به عنوان روش جایگزین مطرح می شود که عمدتاً به دلیل سرعت، حساسیت و اختصاصی بودن نتایج آن می‌باشد. این روش در مقایسه با سایر روش ها دارای حساسیت بیشتر و دامنه اندازه گیری وسیع تری می باشد. در این روش با استفاده از پروب های فلورسنت می توان کینتیک واکنش را بررسی نمود و تعداد باکتری را در نمونه را تعیین نمود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد لذا، احتمال ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و تعیین تیتر باکتری های گروه "مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس" را به روش Real-Time PCR فراهم می کند. این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene یا دستگاه StepOne

طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از ناکارآمدی استخراج DNA و مهار PCR پیشگیری می کند.

## ۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

| برچسب | محتوا | حجم |
|---|---|---|
| TB Mix | میکس آماده برای PCR* | ۳۶۰ میکرولیتر |
| TB S1 | استاندارد ۱: صد هزارکپی در میکرولیتر | ۱۵۰ میکرولیتر |
| TB S2 | استاندارد ۲: ده هزار کپی در میکرولیتر | ۱۵۰ میکرولیتر |
| TB S3 | استاندارد ۳: هزار کپی در میکرولیتر | ۱۵۰ میکرولیتر |
| TB S4 | استاندارد ۴: صد کپی در میکرولیتر | ۱۵۰ میکرولیتر |
| TB S5 | استاندارد ۵: ده‌کپی در میکرولیتر | ۱۵۰ میکرولیتر |
| TB IC | کنترل داخلی* | ۲۵۰ میکرولیتر |
| water | آب مخصوص PCR | ۲۰۰ میکرولیتر |

*۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

## ۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۱۰ درجه الی ۳۰ 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 و بیش از سه بار این مواد خودداری کنید، زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می شود.

## ٤. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR 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 از مایکوباکتریوم
- تیوب ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

## ٥. نکات قابل توجه

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.
- جهت ایمنی قبل از کار با نمونه، ابتدا آن را به روش مناسب عفونت زدایی کنید.
- 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 افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می باشند. 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 لوله های درون کیت، آن ها را کاملا ذوب نموده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل نمایید. 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.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

## ۶. نمونه مناسب

خلط، BAL (bronchoalveolar lavage)، ترشحات برونش ها، مایع مغزی نخاعی (CSF) و مایع صفاقی، نمونه های مناسب برای انجام آزمایش با این کیت هستند.

## ۷. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه از روش ها و کیت های مختلفی می توان استفاده نمود. بهتر است از کیت یا روشی استفاده استفاده کنید که اختصاصاً برای استخراج مایکوباکتریوم طراحی شده باشد. در صورتی که به چنین کیتی دسترسی ندارید، از کیت زیر نیز با اعمال تغییراتی میتوانید استفاده کنید:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat# 51104, Qiagen, Germany)

برای توضیحات بیشتر در مورد نحوه استفاده از کیت فوق میتوانید به راهنمای زیر مراجعه کنید.

Artus M. tuberculosis RG PCR Kit Handbook (Cat# EN1046960, Qiagen, Germany)

در صورتی که تمایل دارید استخراج DNA از نمونه را با استفاده از کنترل داخلی بررسی نمایید، به توضیحات مربوط در قسمت ۸ (کنترل داخلی) مراجعه کنید.

## ۸. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، کیت تشخیص TB، حاوی کنترل داخلی می‌باشد.

کنترل داخلی را می‌توانید در مرحله استخراج استفاده نموده یا صرفاً در مرحله PCR آن را به TB Mix اضافه نمایید. در حالت اول، کنترل داخلی علاوه بر بررسی مهار واکنش، نشانگر کیفیت استخراج نیز می باشد. 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 TB Mix اضافه می نمایید، تنها می توانید مهار واکنش PCR را بررسی کنید. به این منظور به ازای هر واکنش PCR، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را به TB 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 قسمت ۹ استفاده نمایید.

در صورت موفق بودن PCR کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۳۱ تا ۳۷ می شود.

## ۹. دستورکار PCR

ابتدا تمامی لوله ها 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.

تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، ۵ لوله برای استانداردها و یک لوله برای کنترل منفی نیز در نظر بگیرید.

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

**در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به TB Mix اضافه نمایید، مطابق توضیحات قسمت ۸ میکس را آماده نموده و ۱۵ میکرولیتر از آن را به هر لوله منتقل کنید.**

**سپس ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده، استاندارد یا آب به هر لوله اضافه کنید.**

درپوش لوله ها را ببندید و 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.

## ۱۰. 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 بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

از لوح فشرده همراه کیت، فایل TB 0.2 V.3 و یا TB 0.1 V.3 (با توجه به نوع لوله استفاده شده) را باز کنید.

در منوی بالای صفحه، دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و پس از انتخاب محل مورد نظر برای ذخیره فایل آزمایش، دکمه Save را بزنید 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 استانداردها standards را انتخاب کنید. سپس غلظت استانداردها را در ستون سمت راست با عنوان given concentration وارد کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

## ۱۱. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده همراه کیت را انتخاب کنید.

از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. یک کنترل منفی به همراه پنج استاندارد و ده نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، کنترل منفی و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define

Targets and Samples می توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه نمایید و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات، دکمه Start Run را کلیک نموده و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

## ۱۲. 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 10 min** | 1 |
| 2 | **95°C x 15 sec** | 40 |
| | **60°C x 60 sec** | |

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگهای FAM و VIC تنظیم شود.

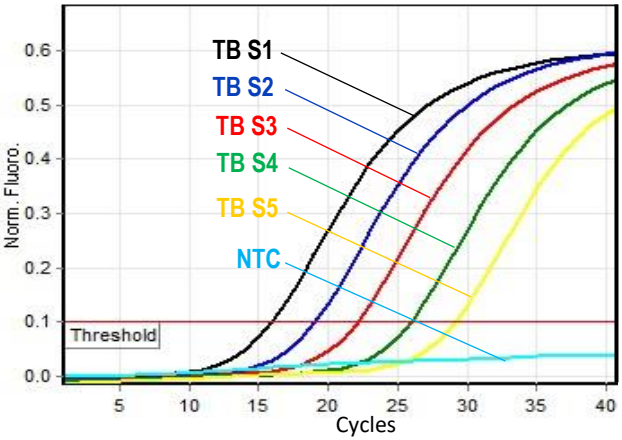
TB Mix موجود در کیت حاوی ROX می باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

## ۱۳. آنالیز نتایج Rotor-Gene

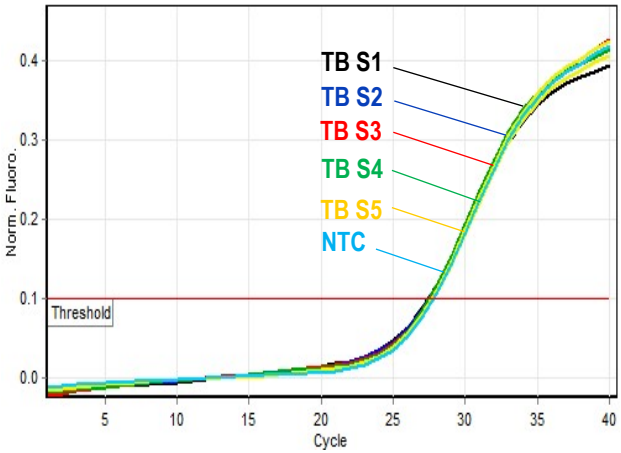
برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold، حداقل را روی ۰/۰۲ یا بالاتر از فلورسانس زمینه قرار داده و دکمه OK را بزنید تا پس از رسم منحنی استاندارد نتایج در جدول پایین صفحه نشان داده شوند. همچنین میتوانید به طور ساده آستانه (threshold)

را روی ۰/۱ قرار دهید. سپس در منوی Analysis مجددا Quantitation و سپس Yellow را کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید.

برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، شاهد منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.




**تصویر ۱.** منحنی استانداردهای TB در کانال سبز دستگاه روتورژن




**تصویر ۲.** منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن

دقت نمایید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **مایکوباکتریوم** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی**می باشد.

**توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموییدی 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 میشود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش میباشد.**

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

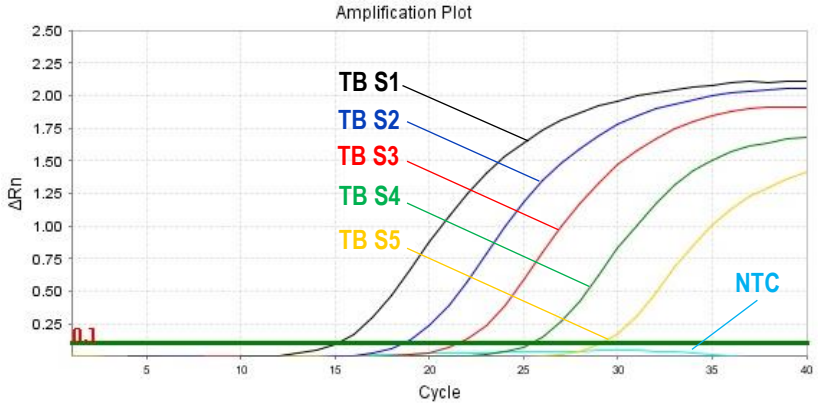
- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای منحنی سیگموید و CT کمتر از ۳۵ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.

- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز منفی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموید و CT بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

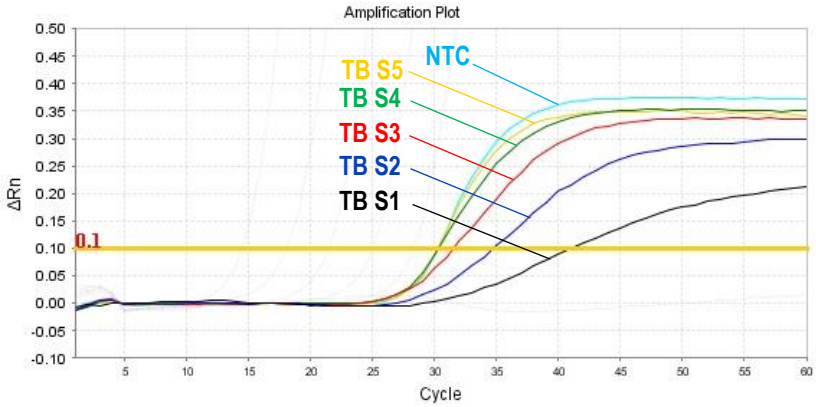
## ۱۴. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه، دکمه Analysis را کلیک کنید. برای TB/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای IC/VIC نیز آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید.

برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، شاهد منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.




**تصویر ۳.** منحنی استانداردهای TB در کانال FAM دستگاه StepOne




**تصویر ۴**. منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه StepOne

توجه داشته باشید که افزایش **تابش TB/FAM** مربوط به **مایکوباکتریوم** و افزایش **تابش IC/VIC** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.

**توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموییدی 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 میشود و(CT آن)در صورت وجود فاقد ارزش میباشد.**

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال TB/FAM مثبت و دارای نمودار سیگموید و CT کمتر از ۳۵ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال IC/VIC می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.

- در صورتی که یک نمونه در کانال TB/FAM منفی باشد ولی در کانال IC/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموید و CT بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال TB/FAM و IC/VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

## ۱۵. محاسبه تیتر

هر کیت حاوی ۵ استاندارد کمّی با غلظت مشخص می باشد که با استفاده از آن ها منحنی استاندارد رسم شده و تیتر مایکوباکتریوم در نمونه بیمار معین می شود.

استانداردهای کیت با واحد کپی در میکرولیتر (copy/ul) مشخص شده اند. برای تبدیل نتایج به صورت کپی در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result(copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/µl)} \times \text{elution volume (µl)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

به طور مثال چنانچه ۲۰۰ میکرولیتر نمونه استخراج و DNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج باید در عدد ۲۵۰ ضرب شوند تا به کپی در میلی لیتر (copy/ml) تبدیل شوند.

## ۱۶. محدوده خطی

محدوده خطی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بررسی شده است و شامل بازه یک میلیون کپی در میکرولیتر تا ده کپی در میکرولیتر می باشد.

## ۱۷. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم مایکوباکتریوم بررسی شده است و معادل یک کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر 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 اطمینانی به مراتب کمتر.

# TB RQ Kit Manual

## For Real-Time PCR Detection and Quantitation of Mycobacterium Tuberculosis Complex

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-10-304
Version 3.4
Summer 2022

Novin Gene

## Table of Contents:


1. Introduction ..... 2
2. Kit Contents ..... 3
3. Storage and Stability ..... 3
4. General Precautions ..... 3
5. Additionally Required Materials ..... 4
6. Specimen, storage and transport ..... 4
7. DNA isolation ..... 4
8. Internal control (IC) ..... 5
9. Quantitation ..... 5
10. PCR Protocol ..... 6
11. Programming of Rotor-Gene ..... 7
12. Programming of StepOne(/Plus) ..... 7
13. Programming of other machines ..... 6
14. Data Analysis: Rotor-Gene ..... 9
15. Data Analysis: StepOne ..... 11
16. Linear Range ..... 11
17. Sensitivity ..... 11

**TB RQ** kit is intended for the quantitative detection of Mycobacterium tuberculosis complex DNA with Rotor-Gene or StepOne machines. This kit is for research use only.

## 1. Introduction

Tuberculosis (TB) is one of the major public health problems worldwide and results in about 2 million deaths annually. This infection is caused by a group of closely related species and subspecies of intracellular pathogens called Mycobacterium tuberculosis complex (MTC) including M. tuberculosis, M. bovis and M. bovis BCG.

While bacterial culturing is still the gold standard for TB diagnosis, Real-Time PCR is increasingly used as an alternative due to its rapid, sensitive and specific results. It also provides the highest sensitivity and widest dynamic range among other methods. In Real-Time PCR, application of fluorescent dye labeled probes allows detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to quantification of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

TB RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection and quantitation of Mycobacterium tuberculosis complex DNA with Rotor-Gene (Qiagen) or StepOne (Applied Biosystems) machines. The kit also incorporates an *Internal Control* (IC) to identify possible DNA extraction failure or PCR inhibition or set up errors.

## 2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with Rotor-Gene and StepOne templates and following reagents:

| Label | Content | Quantity |
|---|---|---|
| TB Mix | PCR Master mix* | 360 µl |
| TB S1 | Standard 1: 100,000 copies/µl | 150 µl |
| TB S2 | Standard 2: 10,000 copies/µl | 150 µl |
| TB S3 | Standard 3: 1,000 copies/µl | 150 µl |
| TB S4 | Standard 4: 100 copies/µl | 150 µl |
| TB S5 | Standard 5: 10 copies/µl | 150 µl |
| TB IC | Internal Control* | 250 µl |
| Water | PCR Grade Water | 200 µl |

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits.

## 3. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at-20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws more than few times to prevent reduced sensitivity.

## 4. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.
- Decontaminate samples prior to DNA extraction.
- Within the pre-PCR work area assigns three separate spaces for: a) Sample storage and extraction; b) Reagent preparation where the TB 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 kit components on crushed ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice while working.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

## 5. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- Mycobacterium/TB DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

## 6. Proper Specimen

Sputum, BAL (bronchoalveolar lavage), bronchial secretion, CSF and peritoneal punction are proper patient samples.

## 7. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. Make sure the kit is especially manufactured for Mycobacterium/TB DNA extraction. If not available, you may use QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) with some modification. For more details please

refer to "artus® M. tuberculosis RG PCR Kit Handbook (Mat# 1046960EN, Qiagen)".
To monitor DNA extraction process, internal control should be applied to the extraction process. For more details, please, refer to section 8 of this handbook.

## 8. Internal control (IC)

In order to evaluate the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition and prevent false negative results, TB RQ kit contains internal control (IC). IC can be used during extraction process or simply added to TB Mix.
To monitor of both DNA extraction and PCR reaction, internal control should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample. Required volume of internal control is 10% of elution buffer. For instance if extracted DNA is eluted with 100ul, then 10ul of internal control should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample. Please note that internal control should not be added directly to the patient sample (i.e. before addition of lysis buffer) as it loses its efficiency.
If IC is added to TB Mix, only PCR inhibition can be monitored. For this purpose, 1 microliter of IC reagent should be added to each reaction. For example, for 10 PCR reactions, 15ul of internal control should be added to 150ul of TB Mix before added to the tubes.
In a successful DNA extraction and PCR test, IC should generate a CT of 31-37 in Yellow/VIC Channel.

## 9. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place required number of tubes on cold block. Consider one tube for each sample plus one for each standard and one for the negative control.

**If IC is introduced during extraction process, pipette 15µl of TB Mix directly to each PCR tube.**
**If IC is added to the TB Mix, add 15ul of the prepared mix (as described in section 8) to each PCR tube.**
**Then add 10ul of extracted DNA, standard or water to each tube.**
Cap the tubes and visually inspect to make sure all are caped securely. Place 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*.

## 10. Programming Rotor-Gene

*Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!*
Open the CD provided in the kit and double click on TB 0.2 V.3 if you are using 0.2ml tubes. If you are using 0.1ml strip tubes, double click on TB 0.1 V.3. Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window, click start again and save program on desired location.

## 11. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on Template and select the file on CD provided with the kit. Click on Plate Setup. One negative control, 5 standards and 10 samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, paste, clear). You may also add/remove samples or change sample names on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly.

## 12. 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 10 min** | 1 cycle |
| 2 | **95°C x 15 sec** | 40 cycles |
| | **60°C x 60 sec** | |

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. The TB Mix contains ROX. The final reaction concentration of ROX is 300nM.

## 13. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure in the sample menu all the standards have been defined as “standard” and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC", respectively.

Analyze data according to manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for **TB (Green channel)** and qualitative analysis for **Internal Control (Yellow channel)**. Briefly, click on analysis menu and then, under Quantitation tab double click on “Cycling A. Green”.

In the pop up for Automatic Threshold increase the minimum or lower bound until it surpasses the negative control or the NTC fluorescence, and then, click on OK.

Repeat the above for “Cycling A. Yellow” but, cancel the Automatic Threshold and manually put threshold on 0.1.

Figures 1 and 2 represent typical graphs for Rotor-Gene machine.

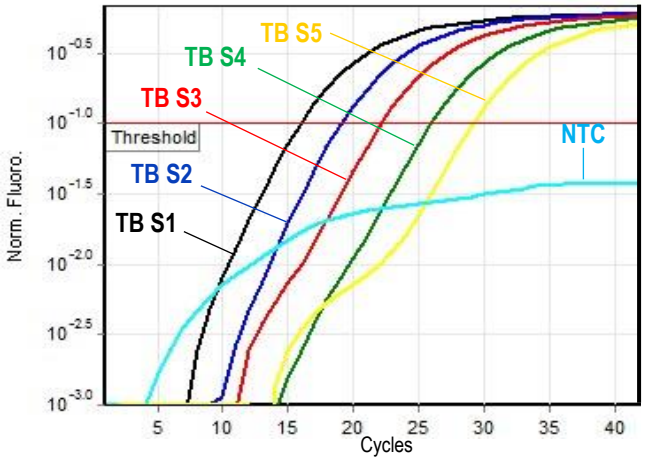



**Figure 1**. Typical TB Graph in Green Channel for RotorGene

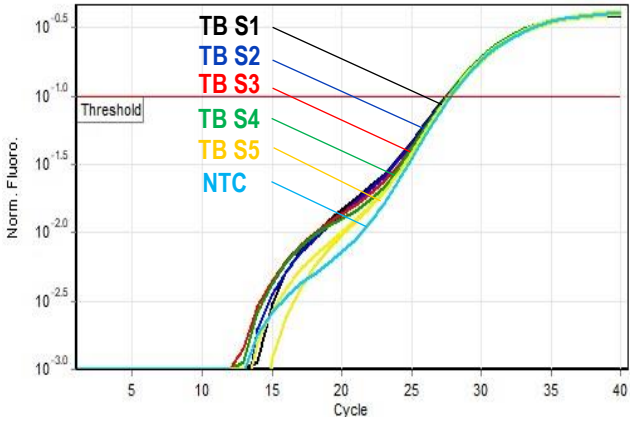



**Figure 2.** Typical IC Graph in Yellow Channel for RotorGene

**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 sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.**

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in Green channel with a sigmoid graph and a CT of less than 35. The titer and quantitation results in the Cycling A. Green are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in Green channel while it is positive in Yellow 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 of Green and Yellow channels.

## 14. Data Analysis: StepOne

Analyze obtained data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on "Analyze" and set the threshold for **TB/FAM** at 0.1 and at 0.1 for **IC/VIC**.
Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

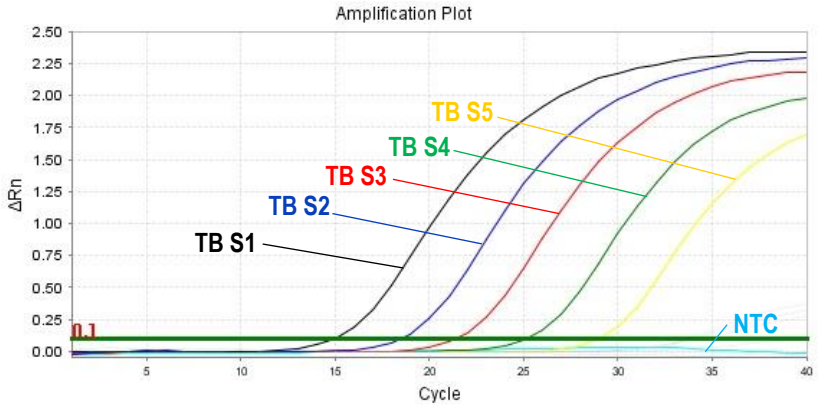



**Figure 3**. Typical TB Graph in FAM Channel for StepOne

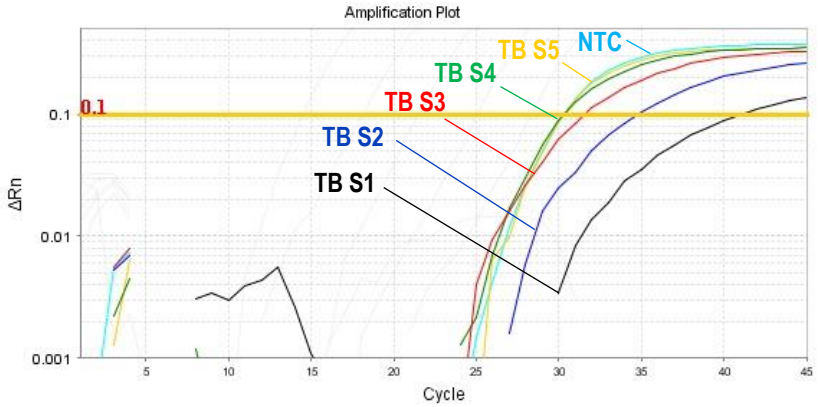



**Figure 4**. Typical IC Graph in VIC Channel for StepOne

**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 sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.**

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in FAM/TB channel with a sigmoid graph and a CT of less than 35. The titer and quantitation results are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in FAM/TB channel while it is positive in VIC/IC 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 of FAM/TB and VIC/IC channels.

## 15. Quantitation

The kit provides 5 quantitation standards with defined titers to generate a standard curve for quantification of samples mycobacterial load. Working with Rotor-Gene machine, the standard curve from a previous run can also be imported for quantification of samples to the recent run. To do so, at least one standard must be used in the current run. Apparently using all five standards in each run will lead to more accurate results.
Quantitation standards are defined as copy/ul. To convert the result to copy/ml following equation should be used:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/µl)} \times \text{elution volume (µl)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

“Sample volume” is the sample volume used for DNA isolation and “Elution volume” is the volume of buffer or water used to elute or dissolve isolated DNA.

## 16. Linear Range

The linear range of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed to be linear in the range of 1,000,000 copies/ul to 10 copies/ul.

## 17. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed a limit of detection equal to 1 copy/ul.