

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53				МИ-10-041
Квалитативна детекција ДНК <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> Real-Time PCR методом					
Страна 1 од 7	Издање:	Важи од:	Сагласан	Одобрио	Копија број
	1	2023-08-03	Проф. Никола Танић	др Санда Лазич руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

Кит МТВ Real - ТМ је тест за квалитативну детекцију у реалном времену комплекса *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. Microti*) у спутуму, урину, бронхијалном лаважу, ткиву и других биолошких материјала.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Кит МТВ Real-ТМ је тест амплификације у реалном времену за квалитативну детекцију *Mycobacterium tuberculosis* комплекса у биолошким материјалима. ДНК *Mycobacterium tuberculosis* се екстрахује из узорак, умножава коришћењем реагенса за амплификацију у реалном времену и детектује коришћењем специфичних проба са флуоресцентним репортер бојама специфичних за *M. tuberculosis* и *M. tuberculosis* IC. *M. tuberculosis* IC је ДНК фрагмент IC 6110 инсертован из *Mycobacterium tuberculosis* модификован и уклониран у бактериофаг λ који садржи фрагменте ДНК који се користе у киту као матрица за прајмере. Интерна контрола (IC) служи као контрола амплификације за сваки појединачно обрађени узорак и за идентификацију могуће инхибиције реакције. IC се детектује у другом каналу који није ДНК *M. tuberculosis*.

МТВ Real - ТМ комплет садржи UDГ-ензим који се додаје у реакциону смјешу. Будући да је деоксиуридин трифосфат (dUTP) присутан само у ампликону, док је деокситимидин трифосфат (dTTP) присутан у МТВ ДНК. Употреба UDГ - ензима разграђује само ампликоне генерисане из претходних циклуса избегавајући могућност контаминације ампликоном. UDГ је активан на собној температури током припреме мастермих-а, док је током амплификације неактиван, не утиче на исправан и жељени ампликон .

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

Аналитичка специфичност

Аналитичка специфичност прајмера и проба потврђена је са 110 негативних узорака *Mycobacterium tuberculosis* комплекс. Нису генерисали никакав сигнал са специфичним ТБ прајмерима и пробама.

Потенцијална унакрсна реактивност МТВ Real-ТМ кита тестирана је у односу на контролну групу која је наведена у следећој табели. Није уочена никаква унакрсна реактивност с овим патогенима:

Табела 1:

Контролна	Резултати Fam канала	Резултати Joe/Hex/Cy3 канала
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	-	+
<i>Mycobacterium flei</i>	-	+
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	-	+
<i>Mycobacterium kansasii</i>	-	+

Болница Бијељина	Страна 2 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-041
		1	2023-08-03	

<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	-	+
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	-	+
<i>Mycobacterium avium</i>	-	
<i>Escherichia coli</i>	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
<i>Streptococcus sp.</i>	-	+
<i>Clostridium diphtheriae</i>	-	+
<i>Brucella sp.</i>	-	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	+
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	+

Аналитичка специфичност је такође потврђена амплификацијом ДНК контролних сојева *Mycobacterium tuberculosis* комплекса: *Mycobacterium tuberculosis* сојеви 192, 5281, 1443, 328, 330, 932, 350, 1579, 1528, 1532, 352, 1030; *Mycobacterium bovis* сојеви 1, 2, 3, 4, 5, 8, БЦГ, 14, 1414, АН 5; *Mycobacterium africanum*; *Mycobacterium microti*. Концентрација ДНК била је 105 геномских еквивалената/мл. Приликом тестирања комплета МТБ Real-TM даје позитивне резултате са свим сојевима који припадају *Mycobacterium tuberculosis* комплекса.

Аналитичка осјетљивост

Аналитичка осјетљивост МТБ Real-TM кита процијењена је серијским разрјеђивањем Стандардни ДНК *Mycobacterium tuberculosis* и QCMD МТБ панела (2003, 2009, 2010). Аналитичка осјетљивост комплета МТБ Real-TM није била мања од 5 CFU/узорку.

Циљно подручје: ИС 6110

4. ВРСТА УЗОРКА

МТБ Real-TM може анализирати ДНК екстраховану из следећих узорка:

Спутум, бронхијална или трахеална лаважа морају се третирати сљедећим поступком:

- Сакупите спутум у ПП епрувете од 50 ml за једнократну употребу са поклопцем на навој.
- У биолошкој сигурносној комори, хомогенизујте узорке након мешања са једнаком запремином 4% раствора NaOH (N -ацетил -Л -цистеин се може додати ако је потребно у количини од 50-70 mg по узорку). Интензивно мијешајти у центрифуги 5-20 минута (у зависности од густине узорка).
- Центрифугирати узорке на 3000 rpm (2800-3000 г) 15 минута и пажљиво одбацити супернатант остављајући 500-1000 µl у епрувети. Ресуспендовати седимент и пребацити га у епрувету од 1,5 ml.
- Центрифугирати узорке на 12000 rpm 5-10 мин, бацити супернатант и користити исту епрувету за узорке од 1,5 ml за изолацију ДНК из седимента узорка.

Болница Бијељина	Страна 3 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-041
		1	2023-08-03	

- ткиво (~ 1,0 гр) хомогенизовано механичким хомогенизатором или скалпелом, стакленим штапићима, тефлонским тучком и растворено у 1,0 ml слане воде или стерилног PBS (1 запремина ткива на 1 запремину физиолошког раствора). Вортексовати снажно и инкубирати 30 минута на собној температури. Пребацити супернатант у нову епрувету од 1,5 ml;
- пуна крв прикупљена у АЦД или ЕДТА епруветама;
- ликвор ускладиштен у “Eppendorf” туби;
- синовијална течност похрањена у “Eppendorf” епрувети;
- седимент урина (користите средњи дио тока);
- плеурни версамент похрањен у “Eppendorf” епрувети;
- течна култура микобактерија конзервирана у Трилон-Б;

5. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

Припрема пацијената се обавља према упутству УП-10-135: *Упутство за узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику*, тачка 11.

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

Стерилна посуда са навојем и широким отвором (спутум)

Стерилна посуда са навојем (бронхоалвеоларни лават, бронхијални секрет, урин)

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

Зона 1: припрема узорка:

- Комплет за екстракцију ДНК (DNK/RNA Prep)
- Биолошки кабинет
- Вортех
- 65 °C ± 2 °C суви топлотни блок
- Столна микроцентрифуга за епрувете типа “Eppendorf” (РЦФ макс. 16.000 x g)
- Сталци за тубе
- Тубе 1,5 - 2,0 ml
- Пипете са стерилним наставцима са филтером, без РНаза
- Контејнер за биолошки отпад
- Рукавице за једнократну употребу, без пудера
- Фрижидер, замрзивач

Зона 2: Амплификација у реалном времену:

- RT-PCR апарат
- Тубице или PCR плоча (плате)
- Радна комора
- Пипете са стерилним врховима филтера без РНазе
- Сталци за тубе
- Амплификациони кит (МТБ Real-TM, Sacace Biotechnological)

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Управљање условима средине и безбједношћу се одвија према упутству УП-10-023:

Употреба средстава личне заштите у Служби за микробиологију са паразитологијом

Болница Бијељина	Страна 4 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-041
		1	2023-08-03	

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Није примјењиво.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

При доспијећу узорак у лабораторију додијељује им се уникатни број протокола према упутству УП-10-135 тачка 4.3. Након тога слиједи обрада узорка која подразумева:

1. ЕКСТАКЦИЈУ ГЕНЕТИЧКОГ МАТЕРИЈАЛА (ДНК МОЛЕКУЛА)
2. ПРИПРЕМУ И ПОКРЕТАЊЕ РЕАКЦИЈЕ ЛАНЧАНЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ (RT-PCR)
3. ИНТЕРПРЕТАЦИЈУ РЕЗУЛТАТА

ПОСТУПАК ЕКСТРАКЦИЈЕ ДНК

Екстракција се обавља у биосигурносном кабинету класе II у просторији за изолацију нуклеинских киселина.

Материјал и опрему намијењене за обраду и рад у просторији за екстракцију користити искључиво на том простору за описане процедуре и не преносити из једне радне просторије у другу.

При раду се обавезно користе дупле једнократне нитрилне рукавице без пудера, које се често дезинфикују или мијењају, нарочито ако дође до просипања течности или када постоји сумња на контаминацију.

Обавезно је ношење мантила (скафандера) који је намијењен само за простор за изолацију нуклеинских киселина.

Зависно од врсте произвођача разликују се и протоколи екстракције. Сваки екстракциони протокол/упутство се чува у електронској форми у Регистратору протокола у оригиналном и/или преведеном издању. Скраћене верзије и изводи из наведених упутстава се по потреби чувају на видном мјесту у просторији за екстракцију.

- Непосредно прије екстракције узорке извадити из фрижидера и темперирати на собној температури, припремити пипете, наставке са дуплим филтером за пипете, контејнере за лабораторијски отпад, тубе.
- Након пресипања узорка у адекватно обиљежене тубе од 2 ml, приступа се поступку екстракције према протоколу.
- Узорак прије изолације мијешати на вортексу, пажљиво отворити, уз мјере личне заштите и у биосигурносном кабинету, те пипетирати око 1.5 ml у тубу за чување узорка на -80°C или -20°C, а потом слиједити инструкције произвођача екстракционог кита. Овако складиштени узорци се могу чувати годину дана на -20°C, а на температури од -80°C и дуже .
- Након пресипања узорка у адекватно обиљежене тубе, приступа се поступку екстракције према протоколу.
- **Кораци у поступку екстракције су:**
 1. лиза ћелија и ослобађање ћелијских елемената
 2. преципитација ослобођених молекула нуклеинских киселина, најчешће алкохолном;
 3. испирање и пречишћавање,
 4. елуција ДНК.

Болница Бијељина	Страна 5 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-041
		1	2023-08-03	

Након посљедњег корака, тј елуције ДНК, изолована ДНК се пребацује у тубе од 1.5 ml и уколико се истог дана припрема Real time PCR реакција, чува се у фрижидеру до момента спајања узорка са мастер миксом, а у супротном се одлаже у замрзивач на -20°C до постављања PCR реакције.

- После рада очистити биосигурносни кабинет и кориштену опрему 1% натријум хипохлоритом потом 70% алкохолом или дестилованом водом и укључити УВ лампу. Спремити реагенсе и прибор за сљедећу употребу.

Може се користити било који комерцијални комплет (кит) за изолацију РНК/ДНК, ако је IVD-СЕ валидиран за типове узорака који су одвије наведени у параграфу „СКУПЉАЊЕ, СКЛАДИШТЕЊЕ И ТРАНСПОРТ УЗОРАКА“.

Sacace Biotechnologies препоручује кориштење сљедећих комплета:

DNK/RNA Prep (Sacace, РЕФ К-2-9);

SaMag TB DNK комплет за екстракцију (Sacace, РЕФ SM008).

Екстракција ДНК се изводи према упутствима произвођача.

Припрема и покретање реакције ланчане полимеразе у реалном времену (*Real time RT PCR*).

Провјерити да ли су сви неопходни уређаји и опрема одговарајући, калибрисани и функционални прије почетка рада. Ради добијања што прецизнијег резултата (да би се избјегла контаминација и добијање лажно позитивних резултата или потенцијална инхибиција) пожељно је поступке припреме реакције радити у одвојеним просторијама и придржавати се одређених мјера опреза:

- Носити чист мантил и рукавице приликом припреме узорака за PCR амплификацију (који нису ношени током руковања амплификованим PCR производима или током припреме узорка)
- Сви наставци за пипете и тубе за центрифугу морају бити ослобођени ДНаза и РНаза
- Мастер микс припремати искључиво у просторији са том намјеном
- Све компоненте PCR реакције одмрзнути (осим уколико произвођач не нагласи другачије) и вортексовати благо ради обезбјеђивања равномјерне дистрибуције свих
- Кратким центрифугирањем спустите течност на дно тубе
- Израчунати број реакција за тестирање и налити реагенсе по упутству произвођача (обухвата негативну контролу, позитивну контролу и узорке који се тестирају). Препорука је да се припреми мастер микс за још 2 додатне реакције да би се компензовале грешке у пипетирању.
- Припремити стрипове за PCR од 8 тубица сходно броју реакција
- Уколико се као негативна контрола користи dH₂O, она се додаје одмах по разливању мастер микса, прије него што се пренесе у просторију за додавање узорака и позитивних контрола. У случају да се негативна контрола екстрахује паралелно са узорцима, тада се и она додаје у просторији за спајање узорака са мастер миксом
- Припремљени мастер микс се кроз прозор преноси у просторију за спајање са узорцима.
- Сва опрема и реагенси који се употребљавају у просторији за мастер микс треба да остану у њој и да се не премјештају или користе у другим просторијама. Након припреме треба очистити и дезинфиковати радну површину и лабораторијски прибор

Спајање узорака са мастермиксом

Болница Бијељина	Страна 6 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-041
		1	2023-08-03	

У просторији за спајање узорака са мастер миксом потребно је такође користити све мјере опреза већ раније поменуте. Неопходно је пажљиво отворати и затварати тубице са узорцима и избјежавати прскање. Узорци се све вријеме држе на апарату за мјешање на температури од 4-8 °C (ThermoMixer C).

Реагенси и све компоненте неопходне за рад треба што је могуће дуже држати затворенима/поклопљенима како би се спријечила контаминација или инхибиција.

Када се додају сви узорци потребно је провјерити да ли су сви стрипови добро затворени, обиљежени и још једном их ставити на центрифугу како би садржај равномјерно пао на дно био и спреман за PCR апарат.

Такође, сва опрема која се употребљава у просторији за спајање узорака треба да остане у њој и да се не премјешта или користи у другим просторијама. Након завршеног рада треба очистити и дезинфиковати радну површину и лабораторијски прибор.

Покретање PCR апарата:

- Укључити апарат за PCR и програмирати га унапријед (према препорукама произвођача кита и упутству за руковање апаратом Quant Studio 5)
- Након тога покренути PCR реакцију. Поставке реакције (термални профил, читавање флуоресценције) претходно извршити према упутствима произвођача датог кита.
- Никад не отворати амплификоване PCR продукте
- По завршетку реакције, не отворати реакционе тубе (стрипове), да не би дошло до контаминације, и одбацити их у складу са локалним препорукама и прописима.
- За прецизније инструкције за поставку PCR реакције погледати оригинално упутство произвођача датог кита. Сва упутства се чувају у лабораторији у оригиналном и/или преведеном издању.

Податке о реакцији ланчане полимеразе у реалном времену (*Real time RT PCR*) уносимо у образац ОБ-10-146: *Радна листа пи-си-ар дијагностике*.

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Није примјењиво.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ (НА ПРИМЈЕР, ЛИПЕМИЈА, ХЕМОЛИЗА, БИЛИРУБИНЕМИЈА, ЛИЈЕКОВИ) И УНАКРСНЕ РЕАКЦИЈЕ

Није примјењиво.

13. ПРИНЦИПИ ПРОЦЕДУРЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА, А КАДА ЈЕ ТО РЕЛЕВАНТНО И МЈЕРНА НЕСИГУРНОСТ ИЗМЈЕРЕНИХ КВАНТИТАТИВНИХ ВРИЈЕДНОСТИ

Није примјењиво.

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Није примјењиво.

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Резултати се издају од 2-7 дана.

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА КАДА РЕЗУЛТАТ НИЈЕ У ОКВИРУ ИНТЕРВАЛА МЈЕРЕЊА

Није примјењиво.

Болница Бијељина	Страна 7 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-041
		1	2023-08-03	

17. АЛАРМАНТНЕ/КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ, КАДА ЈЕ ОДГОВАРАЈУЋЕ

Није примјењиво.

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

Није примјењиво.

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Није примјењиво.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

Оригинално упутство за руковање Quant Studio 5 PCR апарат.

Оригинални научни радови који се баве тематиком Real Time PCR-а (Bustin et al, Vondesample et al...).

Оригинално упутство произвођача MTB Real-TM Quant, Sacace Biotechnologies.

