دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

ویروس *Rubella*

با روش Real-Time PCR

Senmurv Rubella virus PCR kit

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

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۲
شرح کیت ۳
اصول ۳
اطلاعات پاتوژن ۳
محتویات کیت ۳
نگهداری و انتقال کیت ۴
نکات احتیاط عمومی ۵
هشدارها و محدودیت‌ها ۷
عوامل تداخلی ۸
کنترل داخلی(Internal Control)..... ۸
آمادهسازی ۹
برنامه دمایی ۱۰
آنالیز نتایجRotor-Gene ۱۲
نشانه ها ۱۳
اطلاعات تماس ۱۵

شماره رفرانس

- BONRV-24
- BONRV-96

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورت Real-Time ساخته شده است. این محصول برای تشخیص در شرایط آزمایشگاهی ویروس سرخجه (Rubella virus) طراحی شده است. نتایج تشخیصی به‌دست‌آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم ویروس می‌باشد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق فلوروسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به بازکردن مجدد لوله‌های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

اطلاعات پاتوژن

ویروس روبلا (Rubella virus) عامل بیماری سرخجه و از خانواده Togaviridae است. ذرات ویروس روبلا اندازه ای در حدود ۵۰ تا ۷۰ نانومتر دارند که توسط پوششی احاطه شده اند. درون کپسید پروتئینی، ژنوم خطی ویروس که RNA تک رشته ای مثبت به طول تقریبی ۱۰k bp می باشد، وجود دارد.

تنها میزبان ویروس روبلا، انسان است و انتشار آن از طریق قطرات تنفسی آلوده می باشد؛ در دستگاه تنفسی، ویروس روبلا، غدد لنفاوی و سلول های اپیتلیال نازوفارنکس را هدف قرار داده و از طریق گلیکوپروتئین های سطحی پوشش، به سلول های میزبان متصل و وارد میشود. سپس ژنوم آن به عنوان الگویی برای ترجمه ی پروتئین های غیرساختاری نظیر آنزیم ها استفاده شده که پلی پپتید بزرگی را میسازد که به زنجیره ها و پروتئین های کوچک تر شکسته میشود. آنزیم پلی مراز ویروسی شروع به ساختن رشته ی منفی ژنوم ویروس میکند که بعدا منجر به ساخته شدن mRNAهای ویروسی شده و پروتئین های ساختاری مانند کپسید و پروتئین های پوشش ساخته میشوند. در نهایت پس از مونتاژ شدن کپسید و قرارگیری ژنوم های جدید در آن، ذرات

ویروسی با جوانه زدن از سلول خارج شده و به این ترتیب، پوشش غشایی خود را به دست می آورند.

ویروس میتواند یک هفته پس از ابتلا، درخون منتشر و بعد از یک دوره ی نهفتگی ۳-۲ هفته ای، علائم بیماری را نظیر تب، راش های پوستی، التهاب و قرمزی چشم، گرفتگی و آبریزش بینی و درد مفاصل و ... بروز دهد.

اگرچه تظاهرات بالینی این عفونت معمولا ملایم است، بیماری سرخجه در سه ماهه اول بارداری در مادران مبتلا میتواند اثرات مخربی بر روی جنین داشته باشد. آلودگی جنین در رحم ممکن است منجر به مرگ یا سندرم سرخچه (CRS) شود. عفونت در نوزادان تازه متولد شده ممکن است باعث بیماری های قلبی، مغزی، شنوایی یا بینایی شود.

محتویات کیت

Title	24 Tests	96 Tests
	Volume per Vial	Volume per Vial
RV Master-A	336 µl/tube × 1	672 µl/tube × 2
RV Master-B	24 µl/tube × 1	48 µl/tube × 1
Positive Control	150 µl/tube × 1	50 µl/tube × 2
Internal Control	250 µl/tube × 1	500 µl/tube × 1

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری‌گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه‌جایی کیت از یونولیت با درب و یخ‌خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل برروی 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 درنتیجه 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 سانتریفیوژ کنید 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 RNA 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 درحین‌کار 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 انقضا 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 کاملا جدا از محل نگهداری و آماده سازی مسترمیکس صورت پذیرد.
٤. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
٥. 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 به‌طورکامل توصیه می‌شود.
٦. 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، روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یکبار مصرف، وعینک‌های 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 کاملا 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 بپرهیزید.
۱٤. مواد موجود درکیت که بلا استفاده شده اند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱٥. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ۷٥٪ 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 کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود. (استفاده از دستورالعمل: Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated)

۲. پیشنهاد می‌شود 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 می‌شود آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای اضافه کردن نمونه و کنترل مثبت جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید.

۴. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

کنترل‌ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک حاصل از استخراج RNA 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 به‌جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

نمونه می‌تواند کمتر از ۸ ساعت در یخچال با محدوده دما از ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی‌مدت آن، باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و نگهداری شود.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

---

[۱] Good Laboratoty Practice

[۲] Personal Protective Equipment

عوامل تداخلی

(0.5M) EDTA، (1N) HCl، دانه‌های سیلیس (1µl)، خون (1µl)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز عملکرد آزمایش را مهار می‌کنند. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل ردیابی است.

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسید نوکلئیک باید توسط کیت‌های استخراج RNA موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود.

مواد نمونه باید از سلول‌های جدا شده از نمونه‌های سواب حلقی-دهانی یا سرم فرد بیمار استخراج شده باشد.

کیت استخراج RNA در این کیت گنجانده نشده است.

کنترل داخلی(Internal Control)

این کیت به همراه یک کنترل داخلی برای مصرف کننده نهایی تهیه شده است. این امر به کاربر نهایی اجازه می‌دهد تا هم فرآیند تخلیص را چک کند و هم احتمال وجود مواد مهار کننده PCR را بررسی نماید. به طور کل در این حالت کنترل داخلی موجود در کیت را به مقدار**0.2 µl** به ازاء هر **1µl** از حجم حل کردن نهایی ژنوم ویروس Rubella (RV) اضافه می‌شود. برای مثال اگر ژنوم تخلیص شده از RV را در 50µl آب حل می‌کنیم باید در هنگام تخلیص نمونه به آن 10µl 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 حال هیچ گونه کنترل بر روی مرحله تخلیص وجود نخواهد داشت. در این حالت 1µl از کنترل داخلی به 15 µl از master mix

اضافه شده و سپس مقدار 15 µl از این مخلوط با 5 µl از نمونه تخلیص شده مخلوط می‌گردد. در صورت موفق بودن PCR ،کنترل داخلی در CT<34 در کانال نارنجی سیگنال می دهد.

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 ورتکس و سپس اسپین کنید. جهت آماده سازی نمونه ها طبق جدول زیر اقدام نمایید.

جدول نحوه آماده سازی واکنش با IC	
RV Master-A	14 µl
RV Master-B	1 µl
Total Volume	15 µl

۲. چنانچه کنترل داخلی را در حین استخراج وارد کرده اید، به هر لوله مستقیماً **۱۵** میکرولیتر از RV Master Mix به لوله‌های PCR اضافه کنید. چنانچه کنترل داخلی را در زمان PCR می خواهید به مسترمیکس RV اضافه کنید، **1µl** از کنترل داخلی را به **15 µl** از مسترمیکس اضافه کنید و سپس **مقدار15 µl** از این مخلوط را به لوله‌های PCR اضافه کنید.

جدول نحوه آماده سازی واکنش بدون IC	
RV Master-A	14 µl
RV Master-B	1 µl
IC Control	1 µl
Total Volume	15 µl

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.

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

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 اضافه‌کردن 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 No Template Control (NTC) 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 کانال Green توصیف شده است. پس از تنظیم‌کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. درصورت استفاده از دستگاه ABI StepOne گزینه‌رنگ‌رفرنس‌داخلی(Passive Refrence) را حذف کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه Rotor Gene به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول صفحه بعد آورده شده است.

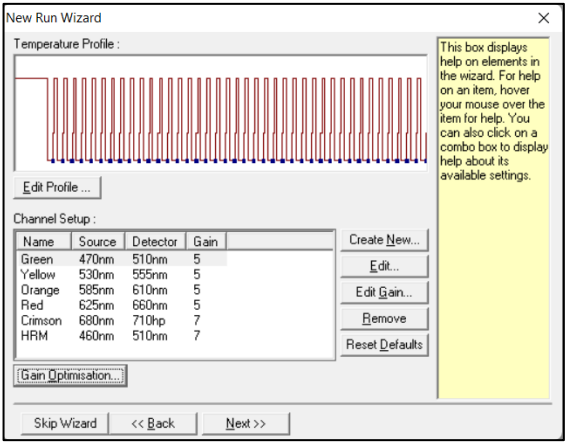
Title	Temperature	Hold	Cycle
Reverse Transcription	50 °C	20 min	1
Pre-Denaturation	95 °C	4 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45

Annealing and Acquisition on Channel Green and Texas RED	58°C	60 sec	

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها

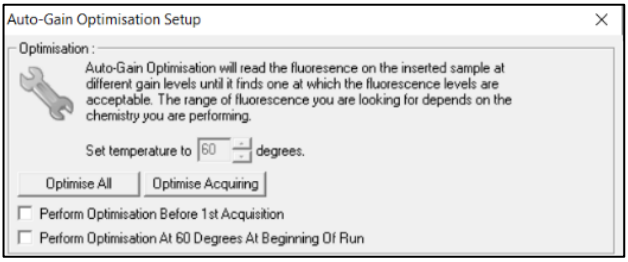
دستگاه **Rotor-Gene**

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



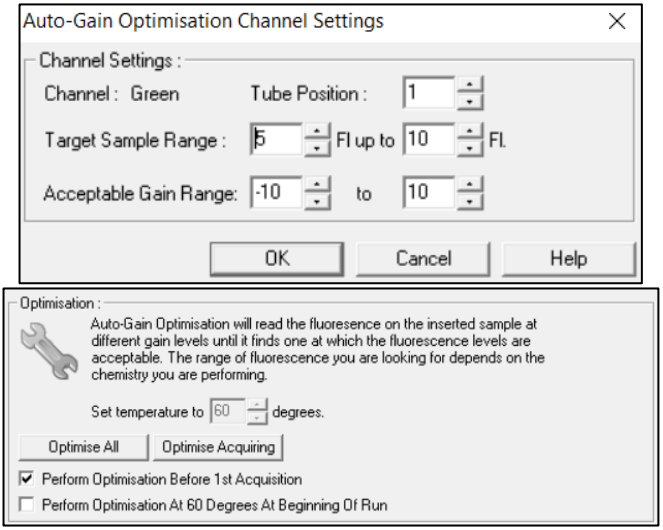
شکل ۱. تنظیمات دستگاه

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



شکل ۲. تنظیمات دستگاه

همچنین Gain دستگاه باید برمبنای تیوب اول انجام شود.
پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌یPerform Optimization Before 1st Acquisation را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۳).



شکل ۳. تنظیمات دستگاه

آنالیزنتایج 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):

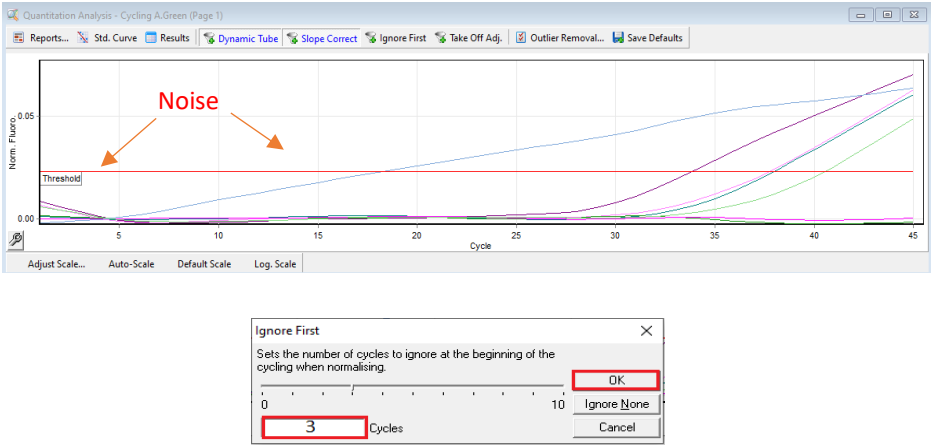
۱. **سیگنال فلورسانس در کانال های Green کاملا مشخص است.** نتیجه تست **Rubella** مثبت است و نمونه تخلیص شده ویروس **Rubella** بوده است.

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

۳. **هیچ سیگنال فلورسانسی در کانالGreen و Orange قابل مشاهده نیست.** در این حالت هیچ گونه نتیجه گیری در مورد تست نمی‌توان انجام داد. تست باید دوباره تکرار شود.

Green	Orange	Result
+	-/+	RV-Positive
-	Ct≤34	RV-Negative
-	-	Invalid

۳-در صورت مشاهده Noise اولیه در نمودار در حالت Linear مطابق تصویر زیر، از گزینه‌ی Ignore First، 3-5 سیکل را بسته به Noise مشاهده شده، Ignore نمایید (شکل ۴).



شکل ۴. تنظیمات دستگاه

حساسیت آنالیتیکال

برای تعیین حساسیت تحلیلی کیت Senmurv Rubella virus PCR، یک سری رقت استاندارد از ۱۰ تا ۰.۱ اسمی معادل ژنوم بر میکرولیتر تنظیم شد و روی Rotor-Gene Q تجزیه و تحلیل شد. ژن ویروس Rubella در ترکیب با کیت Senmurv Rubella virus 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 Rubell virus PCR در دستگاهRotor-Gene Q برابر با 1= Copy/µl می باشد. این به این معنی است که به احتمال ۹۵٪ در هر واکنش 5 Copy/reaction شناسایی گردد.

نشانه ها

برای مصارف پژوهشی	Research Use Only	RUO
کد کالا	Catalog Number	REF
شماره بچ تولید شده	Batch Number	LOT
محدودیت دمایی	Temprature Limitation	
مطالعه دستورالعمل	Concult Instructon For Use	
تعداد تست	Content sufficent for <n> tets	
تاریخ انقضا	Use by	
آدرس	Manufacturer	

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته -گروه سین مورو

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

کد پستی : ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ تلفن : ۲۲۰۸۲۱۲۰ پشتیبان فنی : ۰۹۳۰۱۸۲۱۶۰۱

تلفن های تماس : ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Email : info@senmurv.ir Web Site : www.Senmurv.co