دفترچه راهنمای کیت شناسایی و سنجش کیفی ویروس IBDV با روش RT-PCR - Version 01

شرح کیت

- این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورت Real-Timeساخته¬شده¬است. این محصول برای تشخیص در شرایط آزمایشگاهی تهیه شده و برای تشخیص بیماری برونشیت عفونی پرندگان نتایج تشخیصی به‌دست‌آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم ویروس می¬باشد. 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 باز¬کردن مجدد لوله¬های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.
- بیماری بورس عفونی طیور (IBD) یک بیماری حاد و بسیار مسری است که توسط ویروس IBDV ایجاد میشود. این ویروس، از خانواده‌ی ویروس‌های RNA دار دورشته‌ای بوده و میتواند مرغ، اردک، بوقلمون، شترمرغ و مرغ هندی را آلوده کند اما تنها در ماکیان در حال رشد باعث ایجاد بیماری بالینی میشود. این ویروس به سلول‌های لنفاوی موجود در کیسه‌ی فابریسیوس حمله میکند و باعث سرکوب سیستم ایمنی و در موارد حاد، منجر به مرگ و میر در سن ۳ تا ۶ هفتگی میشود . تاکنون دو سروتایپ ۱ و ۲ برای ویروس IBDV شناسایی شده است که تنها سروتایپ ۱ خاصیت بیماری‌زایی دارد و تمامی واکسن‌های تجاری‌شده علیه این سروتایپ تهیه شده‌اند.
- بیماری در هر دو نوع گله گوشتی و تخم‌گذار مشاهده میشود. طیور مبتلا تا دو هفته پس از ابتلا به عفونت، ویروس را از طریق مدفوع دفع و از راه آب، غذا و حتی حشرات سایر طیور را مبتلا میکنند و بیماری به سرعت گله را در بر میگیرد. همچنین عامل بیماری میتواند از طریق لباس، کفش و دست کارگران یا استفاده از وسایل آلوده در مرغداری‌ها انتقال یابد و به علت مقاومت بالا در برابر گرما وpH ، قدرت بیماری‌زایی خود را تا ۲ ماه در غذا و تا ۴ ماه در مرغداری‌های ضدعفونی نشده حفظ کند .دوره بیماری کوتاه بوده و در عرض چند روز پرنده را تلف میکند .
- بورس عفونی علائم زیادی دارد که طیور بیمار به سرعت آن‌ها را نشان میدهند. مهم‌ترین این علائم عبارتند از :

بی اشتهایی، کاهش سریع خوراک و آب ، اسهال آبکی سفید، اسهال خونی، بی حالی، کزکردگی ، به هم ریختگی پرها و خون ریزی در قسمت مقعد

- تاکنون درمان موثری برای این بیماری یافت نشده است؛ اگرچه استفاده از داروها و مکمل‌های تقویتی نظیر ویتامین‌ها، الکترولیت‌ها و آنتی‌بیوتیک میتواند اثر ویروس را کاهش دهد .واکسیناسیون جوجه‌ها به خصوص قبل از ۳ ماهگی، کاهش تراکم جمعیت و ضد عفونی گسترده زمین های آلوده از موثرترین اقدامات پیشگیرانه به شمار می‌آیند.

محتویات کیت

Title	50 Tests	25 Tests
	Volume per Vial	Volume per Vial
4x Reaction Buffer SYBRGreen	1 ml/tube × 1	500 µl/tube × 1
20x RTase	200 µl/tube × 1	100 µl/tube × 1
IBD-General	400 µl/tube × 1	200 µl/tube × 1
IBD-Classic	400 µl/tube × 1	200 µl/tube × 1
IBD-Antigenic	400 µl/tube × 1	200 µl/tube × 1
IBD-Virulant	400 µl/tube × 1	200 µl/tube × 1
Positive Control	100 µl/tube × 1	100 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 جابه جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید. نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچ گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود .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) ، بیش از ۳ مرتبه 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 استخراجRNA
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه های مختلف و نوك سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزي
۴. بلوك خنك كننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. دستگاه با قابلیت خوانش در کانال Cycling Green
۸. نرم‌افزاز دستگاه‌های مورد استفاده
۹. استریپ و کپ مناسب دستگاه مورد استفاده

نکات احتیاط عمومی

لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و در حین 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 انقضا استفاده نکنید.
- در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
- استفاده از سرسمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free
- نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای نمونه های گرفته شده از بیمار، کنترل ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملا جدا از محل نگهداری و آمادهسازی MasterMix صورت پذیرد.
- همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به خوبی پیپتاژ نمایید و به طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طورکامل توصیه می شود.
- تمام مراحل مربوط به تهیه MasterMix باید بر روی یخ یا جعبه های سرد (Cooling Box)انجام شود. استوک اصلی مربوط به Master Mix بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.
- هنگام کار با مواد شیمیایي، روپوش مناسب آزمایشگاهي، دستکش یکبار مصرف، وعینکهاي محافظ داشته باشید.

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.

- PCRبسیار حساس به آلودگی متقابل است، پسفرآیند کار را با دقت انجام دهید.
- هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
- از تیپ های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتردار برای جلوگیری از ورود آلودگی DNA و RNAاستفاده کنید.
- لطفاً لوله‌های PCR را با دستکش یکبار مصرف بسته‌بندی کرده و به‌درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR پس از امپلیفای را باز نکنید.
- از استفاده ی مجدد مواد یکبار مصرف بپرهیزید.
- مواد موجود در کیت که بلا استفاده شدند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
- پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ تمیز کنید.
- 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 .
- پیشنهاد می‌شود محل استخراجRNA ، آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای آماده‌سازی و اضافه کردن نمونه و نمونه کنترل مثبت جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید.
- 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 استریل بجای نمونه استفاده شود.
۳. کنترل مثبت : (PTC) از کنترل مثبت کیت به‌جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

عوامل تداخلی

(0.5M) EDTA، (1N) HCl، دانه‌های سیلیس) ۱(µl، خون) ۱(µl، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز عملکرد آزمایش را مهار می کنند.

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسید نوکلئیک باید توسط کیت‌های جداسازی موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود .
مواد نمونه باید از سلول‌های نمونه‌برداری شده از بافت‌های لنفواپیتلیالی (bursal tissues) استخراج شده باشد. کیت استخراج RNA در این کیت گنجانده نشده است.

آماده سازی

۱. ابتدا لوله‌ها را روی رک یخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و لوله‌های بافرها و کنترل مثبت را به آرامی ورتکس کنید و به طور مختصر سانتریفیوژ کنید.
۲. برای هر نمونه ۴ لوله PCR آماده کنید.
۳. به هر لوله ۵ میکرولیتر 4x Reaction buffer SYBR Green اضافه کنید. به هر لوله ۱میکرولیتر از محلول 20x RTase اضافه کنید .
۴. به ترتیب در هر کدام از ۴ لوله‌ی مربوط به یک نمونه، ۸ میکرولیتر از یکی از میکس های IBDV-General و IBDV-Classic و IBDV-Antigenic و IBDV-Virulentاضافه کنید.
۵. مقدار ۶ میکرولیتر از نمونه اسید نوکلئیک جدا شده 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 سانتی گراد نگهداری شوند .
۶. لوله‌ها را ببندید، مختصراً سانتریفیوژ کنید، 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.
۷. 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 محل آماده‌سازی مستر واکنش و فضای تمیز باز کنید.
۸. نکته در هر بار انجام تست یک لوله به‌عنوان No Template Control (NTC) باید گذاشته شود. در NTC به‌جای نمونه استخراج شده از آب استفاده می‌شود که برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.بر اساس تعداد واکنش‌ها یا N مقادیر مشخصی از موارد زیر را اندازه‌گیری کرده و مخلوط نمایید.

اضافه کردن الگو

پس از آماده سازی محلول‌ها و انتقال آن به تیوب‌های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۶ میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسید نوکلئیک، ۶ میکرولیتر از کنترل مثبت و۶ میکرولیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.
آماده سازی نمونه طبق جدول زیر صورت گیرد:

Title	Volume
4x Reaction Buffer SYBRGreen	5 µl
20x RTase	1 µl
IBD- **General** or IBD- **Classic** or IBD- **Antigenic** or IBD-**Virulant**	8 µl
Sample or Control	6 µl
Final Volume	20 µl

نکته: در این مرحله، بهتر است از فضاهای جداگانه برای اضافه‌کردن مستر واکنش و نمونه‌های بیمار استفاده کرد.

برنامه دمایی

دستورالعمل برای دستگاهMIC طراحی شده است. پس از تنظیم¬کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه MIC به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول زیر آورده شده است.

	Temperature	Time	Cycle
Reverse Transcription	50 °C	20 min	1
Pre-Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	35
Annealing and Acquisition on Channel Green	60°C	45 sec	
Melt*			

*برای تنظیمات دستگاه به پروتکل زیر مراجعه نمایید.

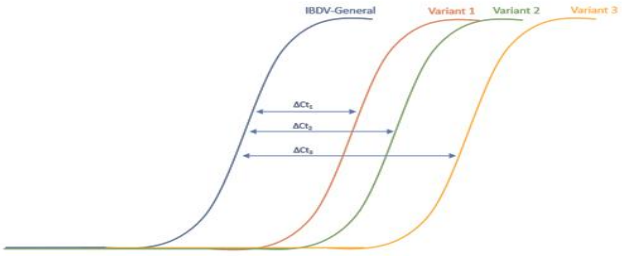
پروتکل تنظیمات دستگاهMIC

ابتدا از منوی سمت چپ گزینه ی Run Profile را انتخاب نموده و سپس تنظیمات زیر را طبق تصویر اعمال نمایید.

آنالیز نتایج

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

۲. تفسیر نتایج، بر مبنای اختلاف Ct واریانت‌هایClassic ، Antigenicو Virulance نسبت به Ct توالی General صورت می‌گیرد؛ بدین نحو که هر چه اختلاف Ct یک واریانت نسبت به Ct توالی General بیشتر باشد، احتمال این که نمونه‌ی مورد آزمایش از نوع آن واریانت باشد بیشتر است .



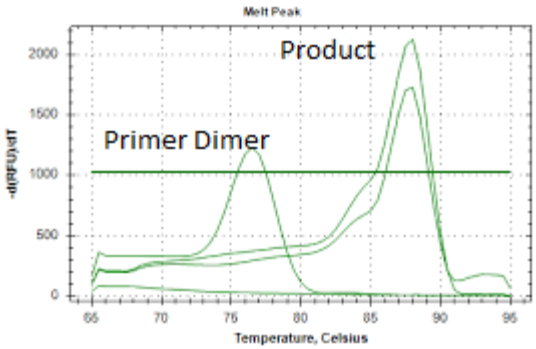
به عنوان مثال در شکل فوق، Variant 1کمترین فاصله را با توالی IBDV-General دارد و بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که نمونه، آلوده به همین واریانت است .

بعد از آنالیز باید نتایج را به صورت زیر تفسیر کرد:

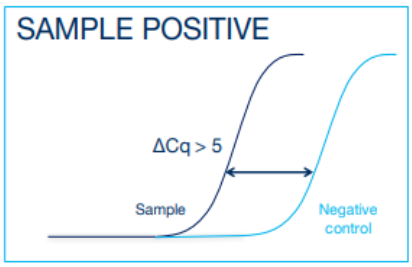
۱. دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد.

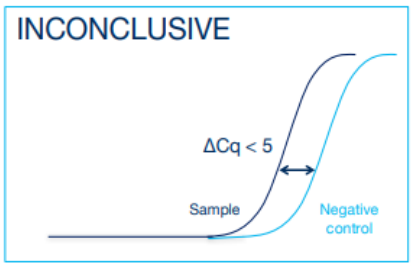
۲. زمانی که منحنی سیگموئیدی نباشد جواب نمونه منفی خواهد بود. به‌علاوه، Ctبه‌دست‌آمده که بالای ۳۰ باشد سبب پاسخ منفی خواهد شد.

۳. واریانتی که به عنوان سویه‌ی اصلی بیماری‌زا شناسایی میشود، باید نزدیکترین Ct به IBDV-general وکمترین Ct را داشته)اختلاف Ct آن حداقل ۲ واحد کمتر از سایر سویه‌ها(باشد.دمای Peak Melt نمونه باید با Peak Melt ntc تفاوت داشته باشد (معمولا دمای Peak Melt ntc حدود ۷۵ درجه است) در صورتیکه دمای Peak Melt ntcو دمای Peak Melt نمونه با هم تطابق داشته باشند در صورتیکه اختلاف Ct حدود ۵ سیکل باشد، تست معتبر است. . در ادامه شکلهای مربوطه آمده است:



دمای Peak Melt محصول نمونه مثبت با Peak Melt Ntc (که مربوط به دایمر پرایمر می باشد) متفاوت است.





در صورتیکه دمای Peak Melt Ntc و دمای Peak Melt محصول نمونه مثبت با هم تطابق داشته باشند فقط در صورتیکه اختلاف Ct حدود ۵ سیکل باشد، تست معتبر است.

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

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