کیت شناسایی و سنجش کیفی

ویروس IBV با روش Real-Time PCR

دفترچه راهنما

Doc. # : IFU-IBV-01 Doc. Version : 02 Revision Date : 07-10-2022

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۲
شرح کیت..... ۳
اصول..... ۳
اطلاعات پاتوژن..... ۳
محتویات کیت ۴
نگهداری و انتقال کیت..... ۴
نکات احتیاط عمومی ۵
هشدارها و محدودیت‌ها..... ۶
عوامل تداخلی..... ۷
آماده سازی ۸
اضافه کردن الگو..... ۸
برنامه دمایی ۹
آنالیز نتایج ۱۱
نشانه ها ۱۳
اطلاعات تماس..... ۱۳

شماره رفرانس

- BONIBV-25
- BONIBV-50

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورت Real-Time ساخته‌شده‌است. 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.

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

تنها کرونا ویروسی که ماکیان را آلوده می کند به عنوان IBV شناخته می شود. IBV یکی از شناخته شده ترین گاماکرونا ویروس‌ها محسوب می‌شود. این ویروس یکی از مهمترین علل نگرانی های اقتصادی محسوب می‌شود. واکسیناسیون به طور گسترده ای برای کنترل IBV استفاده می شود. واکسن برای سلامت جوجه ها و هم مرغ های گوشتی هم مرغ های تخم گذار مفید است. واکسن‌های غیر فعال شده در امولسیون های روغنی جهت واکسیناسیون مرغ های گوشتی و مرغ های تخم‌گذار پیش از تخم گذاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. سویه‌های ژنوتیپ های بسیار متنوعی در میان گونه‌ی کرونا ویروس ماکیان جا می‌گیرند. برخی از این سویه ها تنها دستگاه تنفسی را بیمار می‌کنند و سویه‌های دیگر می‌توانند در سراسر بدن پراکنده شوند و کلیه ها یا مجاری تناسلی رو آلوده می‌کنند.

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
IBV-**General**	400 µl/tube × 1	200 µl/tube × 1
IBV-**MASS**	400 µl/tube × 1	200 µl/tube × 1
IBV-**QX**	400 µl/tube × 1	200 µl/tube × 1
IBV-**793B**	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 نگهداری‌گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه‌جایی کیت از یونولیت با درب و یخ‌خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت دردمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گاه نباید بیشتر از یک‌ساعت 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)، 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 استخراج RNA
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوک سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزی
۴. بلوک خنک کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
٦. گان و دستکش
۷. دستگاه با قابلیت خوانش در کانال Cycling Green
۸. نرم‌افزار دستگاه‌های 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. استفاده از سرسمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free
۳. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای نمونه‌های گرفته شده از بیمار، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده‌سازی Master Mix صورت پذیرد.
٤. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
۵. 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 Master Mix باید بر روی یخ یا جعبه‌های 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.
٧. هنگام کار با مواد شیمیایی، روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یکبار مصرف، وعینک‌های محافظ داشته باشید.
٨. 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.
٩. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
١٠. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
١١. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتردار برای جلوگیری از ورود آلودگی DNA, RNA استفاده کنید.
١٢. لطفاً لوله‌های PCR را با دستکش یکبارمصرف بسته‌بندی کرده و به‌درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR پس از امپلیفای را باز نکنید.
١٣. از استفاده ی مجدد مواد یکبار مصرف بپرهیزید.
١٤. مواد موجود درکیت که بلا استفاده شدند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
١٥. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ٧٥٪ و وایتکس ١٠٪ تمیز کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

١. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP[1] توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)[2] انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود. (استفاده

[1] Good Laboratoty Practice
[2] Personal Protective Equipment

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 محل استخراج RNA، 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.

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 استریل بجای نمونه استفاده شود.

۳. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به‌جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

نمونه باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و نگهداری شود.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

عوامل تداخلی

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

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 بافت مخاطی مجرای تنفسی یا سکال تانسیل (cecal tonsil) باشد. کیت استخراج RNA در این کیت گنجانده نشده است.

آماده‌سازی

۱. ابتدا لوله‌ها را روی‌رک‌یخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و لوله‌های بافرها و کنترل مثبت را به آرامی ورتکس‌کنید و به‌طور 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 IBV-General و IBV-MASS و IBV-QX و IBV-B/793 اضافه 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 سانتی‌گراد 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 ویال‌کنترل مثبت را تنها در محل آماده‌سازی مستر واکنش و فضای تمیز باز کنید.

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 اسیدنوکلئیک، 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
IBV- **General** or IBV- **QX** or IBV- **793B** or IBV-**Mass**	8 µl
Sample or Control	6 µl
Final Volume	20 µl

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

برنامه دمایی

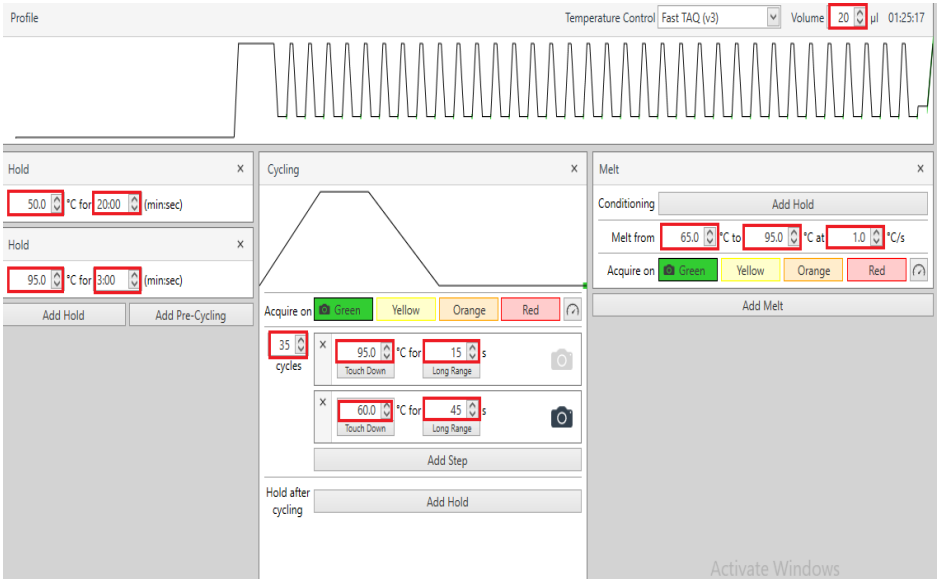
دستورالعمل برای دستگاه MIC طراحی شده است. پس از تنظیم‌کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه MIC به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول زیر آورده شده است.

	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.

۱. پروتکل تنظیمات دستگاه MIC:

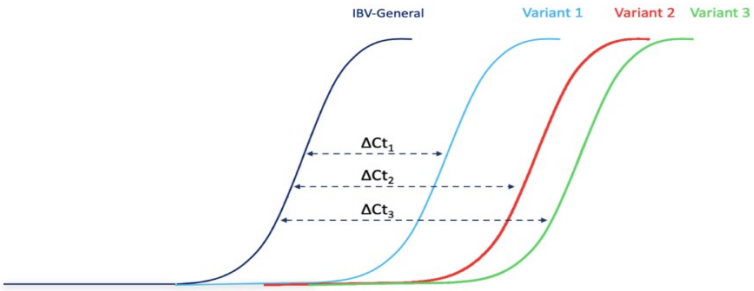
ابتدا از منوی سمت چپ گزینه‌ی Run Profile را انتخاب نموده و سپس تنظیمات زیر را طبق تصویر اعمال نمایید.



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 واریانت‌های QX، Mass و 793B نسبت به Ct توالی General صورت می‌گیرد؛ بدین نحو که هر چه اختلاف Ct یک واریانت نسبت به Ct توالی General کمتر باشد، احتمال این که نمونه‌ی مورد آزمایش از نوع آن واریانت باشد بیشتر است.



به عنوان مثال در شکل فوق، Variant 1 کمترین فاصله را با توالی IBV-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.

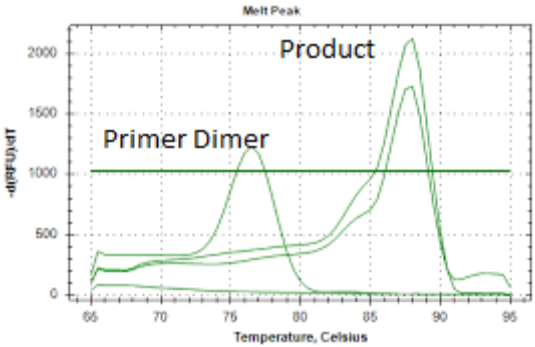
۲. زمانی که منحنی سیگموئیدی نباشد جواب نمونه منفی خواهد بود. به‌علاوه، Ct به‌دست‌آمده که بالای ۳۰ باشد سبب پاسخ منفی خواهد شد.

۳. واریانتی که به عنوان سویه‌ی اصلی بیماری‌زا شناسایی میشود، باید نزدیکترین Ct به IBV-general وکمترین Ct را داشته (اختلاف Ct آن حداقل ۲ واحد کمتر از سایر سویه‌ها) باشد.

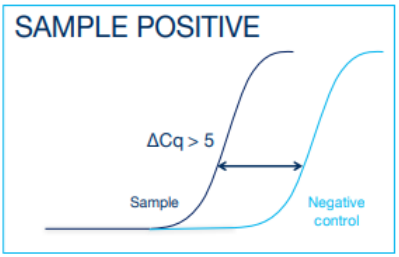
دمای Peak Melt نمونه باید با Ntc Peak Melt تفاوت داشته باشد (معمولا دمای Peak Melt Ntc حدود ۷۵ درجه است) در صورتیکه دمای Ntc Peak Melt و دمای Peak Melt نمونه با هم

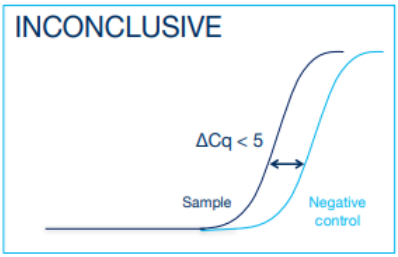
تطابق داشته باشند در صورتیکه اختلاف Ct حدود ۵ سیکل باشد، تست معتبر است. در ادامه شکلهای مربوطه آمده است:

دمای Peak Melt محصول نمونه مثبت با Ntc Peak Melt (که مربوط به دایمر پرایمر می



باشد) متفاوت است.





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

نشانه ها

برای مصارف پژوهشی	Research Use Only	
کد کالا	Catalog Number	
شماره بچ تولید شده	Batch Number	
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

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