دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

باکتری MG-MS

با روش

Real-Time PCR

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۳
شرح کیت..... ۳
اصول..... ۳
اطلاعات پاتوژن..... ۳
محتویات کیت ۴
نگهداری و انتقال کیت..... ۴
نکات احتیاط عمومی ۵
هشدارها و محدودیت‌ها..... ۷
عوامل تداخلی..... ۸
آمادهسازی ۸
اضافه کردن الگو..... ۹
برنامه دمایی ۱۰
آنالیز نتایج ۱۱
جدول تفسیر نتایج ۱۱
نشانه ها ۱۲
اطلاعات تماس..... ۱۲
پشتیبان فنی..... ۱۲

شماره رفرانس

- BONMGMS-50
- BONNMGMS-100

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 سویه‌ی بیماری زا مایکوپلاسما گالیسپتیکوم 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

چندین مایکوپلاسما قادر به ایجاد مایکوپلاسموزیس در طیور میباشند. از جمله مهمترین آنها مایکوپلاسما گالی سپتیکوم (MG) و مایکوپلاسما سینوویه (MS) میباشد MG و MS به عنوان اصلی ترین عوامل بیماری زای پرندگان، خسارات اقتصادی فراوانی را به صنعت مرغداری وارد میکند.خسارات اقتصادی مایکوپلاسما ها چه به صورت اولیه در اثر مشکلات تنفسی و ابتلای مفاصل یا در اثر همزمانی آن با عفونت های پیچیده ویروسی و میکروبی تحت شرایط نامناسب بهداشتی و مدیریتی بروز می نماید.

مایکوپلاسما گالی سپتیکوم یکی از اقتصادی ترین مایکوپلاسمای بیماریزا طیور است. در تجارت بین المللی توانایی تعیین وضعیت عفونت در محصولات صادراتی (تخم مرغ قابل جوجه کشی و جوجه یک روزه) اهمیت زیادی داشته و ضروری میباشد. عفونت با مایکوپلاسما گالی سپتیکوم

تظاهرات بالینی متنوعی داشته که احتمالا بیماری مزمن تنفسی و افت کیفیت لاشه های گوشتی بالاترین رخداد را دارند که منتهی به ضبط لاشه در کشتارگاه میشود.

مایکوپلاسما گالی سپتیکوم غالباً به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده بیماریهای کمپلکس شناخته میشود و رابطه میان این باکتری و ویروس های مختلف تنفسی ویروس های نیوکاسل، برونشیت عفونی، آنفولانزای تیپ A و لارنگوتراکئیت، اشریشیاکلی، هموفیلوس پاراگالینارم، گامبورو و سایر عوامل کاملاً مشخص شده است. واکسن های بیماری نیوکاسل و برونشیت عفونی ممکن است واکنش های چشمگیری در پرندگان آلوده به مایکوپلاسما گالی سپتیکوم ایجاد کنند. MS, بیشتر به صورت عفونت تحت بالینی قسمت فوقانی دستگاه تنفس روی میدهد. MS هنگامی که همراه با بیماری نیوکاسل یا برونشیت عفونی یا هر دو است، باعث عفونت کیسه های هوایی میشود. در سایر موارد عفونت MS سیستمیک شده و به سینوویت عفونی منجر میشود که یک بیماری عفونی حاد تا مزمن در ماکیان و بوقلمون است. در این میان وجود تستهای برای شناسایی MG و MS ضرورت یافته است،

محتویات کیت

Title	100Tests	50 Tests
	Volume per Vial	Volume per Vial
Mix MG-MS	1500 µl/tube × 1	750 µl/tube × 1
Nuclease Free Water	500 µl/tube × 1	250 ml/tube × 1
Positive Control MG-MS	200 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) 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 DNA
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, Orange, Yellow
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. استفاده از سرسمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free
۳. نگهداری و تخلیص نمونه‌های گرفته شده، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده‌سازی مسترمیکس صورت پذیرد.
۴. 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.
۶. 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 شیمیائي، روپوش مناسب آزمایشگاهي، دستکش یکبار مصرف، وعینك‌هاي 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 DNAاستفاده کنید.
۱۲. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یکبارمصرف بسته‌بندی کرده و به‌درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR پس از امپلیفای را باز نکنید.
۱۳. از استفاده ی مجدد مواد یکبار مصرف بپرهیزید.
۱۴. مواد موجود درکیت که بلا استفاده شدند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱۵. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ۷۵٪ 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 محل استخراج DNA، 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 DNA 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

EDTA (0.5M)، HCl (1N)، 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 جداسازی DNA موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود.

مواد نمونه باید از سلول‌های نمونه‌برداری شده از سواب تنفسی نای استخراج شده باشد.

کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

آماده‌سازی

۱. ابتدا لوله‌ها را روی‌رک‌یخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و لوله‌های بافر واکنش، پرایمر پروب و کنترل مثبت را به آرامی ورتکس‌کنید و به‌طور مختصر سانتریفیوژ کنید.

۲. 15 میکرولیتر از Mix MG-MS را به لوله‌های PCR اضافه کنید.

۲-۱. به ازای هر ریکشن 1 مایکرولیتر از کنترل داخلی (Internal Control)، را به 15 مایکرولیتر Mix MG-MS اضافه نمایید. به عنوان مثال به ازای 10 ریکشن، 10 مایکرولیتر از کنترل داخلی را به 150 مایکرولیتر Mix MG-MS اضافه نموده و در نهایت 15 مایکرولیتر از میکس آماده شده را به هر لوله PCR اضافه نمایید.

۳. مقدار 10 میکرولیتر از نمونه اسید نوکلئیک جدا شده یا 10 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.

۴. لوله‌ها را ببندید، مختصراً اسپین 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.

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 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، 10 میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسید نوکلئیک، 10 میکرولیتر از کنترل مثبت ,10 میکرولیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

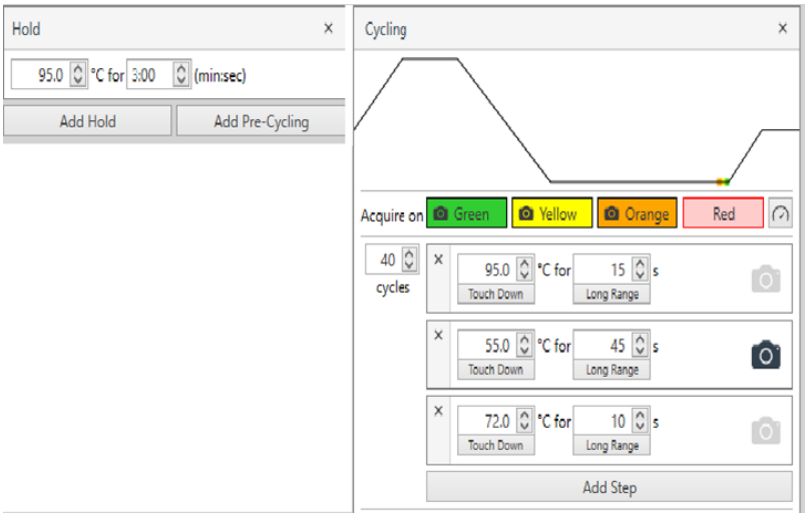
Reaction Setup	Volume
Mix MG-MS	15 µl
Interna Control	1 µl
Sample or Control	10 µl
Final volume	25 µl

برنامه دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال Green ,Orange,Yellow 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.

	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	35
Annealing and Acquisition on Channel Green,Orange,Yellow	55°C	45 sec	
Extension	72°C	10 sec	

برای اعمال تنظیمات در دستگاه MIC طبق تصویر زیر اقدام نمایید.



آنالیز نتایج

۱.آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در کانال رنگی سبز، نارنجی، زرد آستانه را در بازه‌ی 0.02 قرار دهید..

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

۱. چنانچه نمونه دارای در کانال سبز دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد، مبتلا به سویه MG , و در صورتی که نمونه در کانال نارنجی دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد مبتلا به MS و در صورتی که در هر دو کانال سبز و نارنجی نمونه دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد، مبتلا به هر دو سویه MG و MS می باشد.

۲. زمانی که منحنی سیگموئیدی نباشد و سیگنالی در کانال سبز، نارنجی دیده نشود، نمونه مبتلا به سویه MG, MS نمی باشد.

۳. مثبت بودن نتایج فوق منوط به مثبت شدن نمونه کنترل داخلی می باشد.

جدول تفسیر نتایج

Green Channel	Orange Channel	Yellow Channel	
+	+	+	MG,MS Positive
+	-	+	MG Positive
-	+	+	MS Positive
-	-	+	Negative
-	-	-	Invalide

نشانه ها

	InVitro Diagnostos Medical Device	تشخیص آزمایشگاهی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Concult Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficent for <n> tets	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

اطلاعات تماس

تهران ، سعادت آباد ، میدان فرهنگ ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد ،خیابان حیدر نیا (دوم شرقی) ، پلاک ۹

تلفن های تماس : ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰ داخلی ۲۱۵

پشتیبان فنی

در صورت بروز مشکل فنی با شماره ۰۹۳۰۱۸۲۱۶۰۱تماس حاصل فرمایید در غیر این صورت با شماره های شرکت تماس حاصل فرمایید .