؛

کیت شناسایی و سنجش کیفی

ویروس NDV با روش Real-Time PCR

دفترچه راهنما

Doc. : Version: Revision Date:

شرکت فن‌آوری بن یاخته

فهرست مطالب

شماره رفرانس 2

شرح کیت 3

اصول 3

اطلاعات پاتوژن 3

محتویات کیت 4

نگهداری و انتقال کیت 4

نکات احتیاط عمومی 5

هاهشدارها و محدودیت 6

عوامل تداخلی 7

آمادهسازی 7

اضافه کردن الگو 8

برنامه ریزی دمایی 9

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌های مختلف: 9

آنالیز نتایج 11

جدول تفسیر نتایج 11

نشانه ها 12

اطلاعات تماس 12

شماره رفرانس

- BONNDV-50
- BONNDV-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 سویه‌های حاد بیماری نیوکاسل 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

بیماری نیوکاسل یک بیماری ویروسی مسری در پرندگان است که بسیاری از گونه های خانگی و وحشی پرندگان را درگیر می کند. علائم عفونت با NDV بسته به عواملی مانند سویه ویروس و وضعیت ایمنی، سن و گونه های میزبان بسیار متفاوت است. دوره کمون برای این بیماری بین دو تا 15 روز است.

عامل بیماری نیوکاسل (ND) یک ویروس RNA تک رشته از خانواده Paramyxoviridae در جنس Avulavirus است. ده سروتیپ دارد که از APMV-I تا APMV-10 معین شده و ویروس NDV به عنوان APMV-1 تعیین شده است. بسیاری از گونه های پرندگان خانگی و وحشی بسیار مستعد ابتلا به بیماری هستند. کیت حاضر قادر است انواع حاد بیماریزای خطرناک این ویروس را شناسایی کند.

میزان بیماری و مرگ و میر در گونه های مختلف پرندگان، از طریق سویه های مختلف ویروس متفاوت است.انسان نیز ممکن است آلوده شود. که با قرمز شدن، ورم زیاد، ادم پلک و التهاب و گاها خوونریزی ملتحمه چشم و علائم شبیه آنفولانزا تظاهر می کند اما خطرناک نیست.

محتویات کیت

Title	100Tests	50 Tests
	Volume per Vial	Volume per Vial
4x Reaction Buffer	500 µl/tube × 1	250 µl/tube × 1
20x RTase	100 µl/tube × 1	50 µl/tube × 1
NDV-Primer/Probe	100 µl/tube × 1	50 µl/tube × 1
Nuclease Free Water	1 ml/tube × 1	1 ml/tube × 1
Positive Control	200 µl/tube × 1	100 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 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 (15 تا 25 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:

1. کیت استخراج RNA
2. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوک سمپلر فیلتردار

3. سانتریفوژ رومیزی
4. بلوک خنک کننده
5. وایتکس10 درصد
6. گان و دستکش
7. دستگاه با قابلیت خوانش در کانال‌های فلوروسنت مخصوص Cycling Green
8. نرم‌افزار دستگاه مورد استفاده
9. استریپ و کپ مناسب دستگاه مورد استفاده

نکات احتیاط عمومی

1. 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.

2. استفاده از سرسمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free
3. 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.
4. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
5. 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.
6. 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.
7. هنگام کار با مواد شیمیائی، روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یکبار مصرف، وعینک‌های محافظ داشته باشید.
8. 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.

9. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
10. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
11. 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.
12. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یکبارمصرف بسته‌بندی کرده و به‌درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR پس از امپلیفای را باز نکنید.
13. از استفاده ی مجدد مواد یکبار مصرف بپرهیزید.
14. مواد موجود درکیت که بلا استفاده شدند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
15. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول 75٪ و وایتکس 10٪ تمیز کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

1. 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 از دستورالعمل: Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated)
2. پیشنهاد می‌شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس 10 درصد تمیز شود و همینطور بعد از کار لامپ UV زده شود.
3. 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.
4. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

[1] Good Laboratoty Practice

[2] Personal Protective Equipment

کنترل‌ها

1. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک حاصل از استخراج RNA استفاده شود.
2. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
3. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به‌جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

نمونه می‌تواند کمتر از 8 ساعت در یخچال با محدوده دما از 2 تا 8 درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی‌مدت آن، باید در دمای 20- 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 (40 گرم در 100 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 موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود.
مواد نمونه باید از سلول‌های نمونه‌برداری شده از سواب تنفسی نای و کلواک استخراج شده باشد.
کیت استخراج RNA در این کیت گنجانده نشده است.

آماده‌سازی

1. 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.
2. 5 میکرولیتر از Reaction Buffer را به لوله‌های PCR اضافه کنید.
3. به هر لوله به میزان 1میکرولیتر از 20x RTase و 1 میکرولیتر NDV-Primer/Probe و همچنین 7 میکرولیتر از Nuclease Free Water اضافه کنید.

3. مقدار 6 میکرولیتر از نمونه اسید نوکلئیک جدا شده یا 6 میکرولیتر کنترل مثبت را به لوله‌های PCRجداگانه اضافه کرده و با پیپتینگ مخلوط کنید. در حین تهیه PCR لازم است همه اجزا در دمای 2 تا 8 درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. از موادبالینی منفی می‌توان به‌عنوان کنترل جداسازی منفی استفاده کرد.

4. 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.

5. 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، 6 میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسیدنوکلئیک، 6 میکرولیتر از کنترل مثبت و6 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
4x Reaction Buffer	5 µl
20x RTase	1 µl
NDV-Primer/Probe	1 µl
Nuclease Free Water	7 µl
Sample or Control	6 µl
Final volume	20 µl

برنامه ریزی 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.

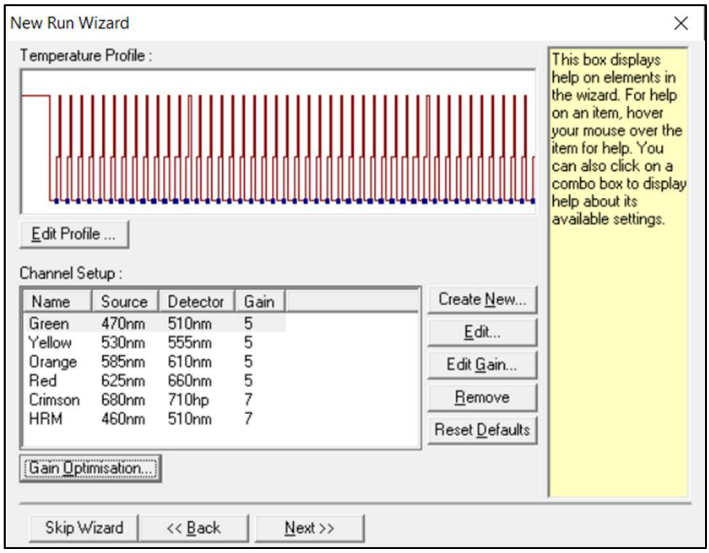
	Temperature	Hold	Cycle
Reverse Transcription	50 °C	20 min	1
Pre-Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	40
Annealing and Acquisition on Channel Green	55°C	45 sec	
Extension	72°C	10 sec	

علاوه بر تعریف دمایی دستگاه که در قسمت‌بالا آمده است دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم‌گردد. اندازه‌گیری تابش فلورسانس باید برای رنگ‌های FAM تنظیم شود.

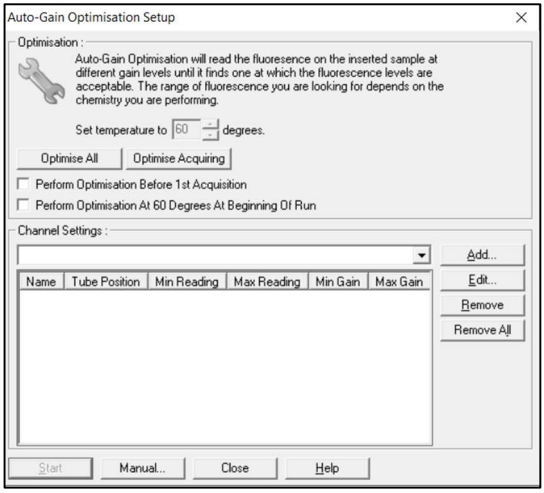
تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌های مختلف:

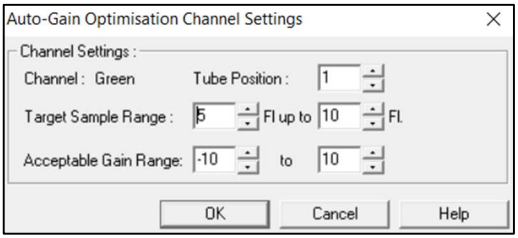
دستگاه Rotor-Gene:

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه ی Gain Optimization را انتخاب کنید.



در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای کانال سبز بازه ی Target sample range از 5 تا 10 (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود.





پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisation را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید.

آنالیز نتایج

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

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

1. چنانچه نمونه دارای در کانال سبز دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد، مبتلا به سویه حاد بیماریزای خطرناک NDV می باشد.

2. زمانی که منحنی سیگموئیدی نباشد و سیگنالی در کانال سبز دیده نشود، نمونه مبتلا به سویه حاد بیماریزای خطرناک NDV نمی باشد.

جدول تفسیر نتایج

	Green	Result
NDV Mix	+	NDV positive
	-	NDV negative

نشانه ها

مفهوم	نشانه	مفهموم	نشانه
دور از نور و گرما		کنترل مثبت	
برای مصارف پژوهشی		تعداد تست	
شماره بچ تولید شده		کد کالا	
محدودیت دمایی		تاریخ انقضا	
مطالعه دستورالعمل		آدرس	

اطلاعات تماس

تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار 24 متری سعادت آباد، خیابان حیدرنیا (دوم شرقی)، پلاک 9

تلفن های تماس : 02122082120 داخلی 215

NDV PCR Detection Kit

Instruction for Use

No ۹ , Heidarnia Street,۲۴ Metri Blv, Farhang Square, Sadat Abad ,Tehran, Iran

Tel: +982122082120

Web Site: www.Senmurv.co

Email: info@senmurv.ir