



famtaQUANT EBV Real-Time PCR Kit

کیت تشخیص مولکولی و تعیین میزان ویروس اپشتین بار
به روش Real-Time PCR

راهنمای سریع

Cat Number: 2040110 (24 Reactions)
2040111 (48 Reactions)
2040112 (96 Reactions)



مقدمه

EBV (Epstein-Barr virus) عامل بیماری مونونوکلئوز عفونی بوده و با برخی از انواع سرطان مانند لنفوم هوچکین، لنفوم بورکیت و بیماری‌هایی مانند ایدز (HIV)، مولتیپل اسکلروز و ام اس در ارتباط است. اپشتین بار ویروس از گروه هریس ویریده‌ها و زیرخانواده گاما هریس ویرینه است که هریس ویروس تیپ چهار (HHV-4) نیز نامیده می‌شود. ژنوم DNA دورشته‌ای داشته و اندازه آن بین 120 تا 180 nm می‌باشد. بسیاری از افراد در دوران کودکی به EBV آلوده می‌شوند. بررسی‌های سرواپیدمیولوژی نشان می‌دهد که بیش از ۹۵٪ از بزرگسالان در جهان با ویروس EBV مواجه شده‌اند. کیت حاضر جهت تشخیص ویروس EBV به روش Real-Time PCR طراحی شده و قادر است سه ناحیه ژنومی محافظت شده و اختصاصی از این ویروس را با حساسیت و اختصاصیت بالا تشخیص دهد. همچنین جهت بررسی فرآیند استخراج اسید نوکلئیک ویروس و پیشگیری از نتایج منفی کاذب یا وجود مهار کننده واکنش PCR، کنترل داخلی Exogenous در محتویات این کیت در نظر گرفته شده است.

محتویات کیت

جدول ۱) محتویات کیت

Color	Title	Volume per vial	24 Rxns	48 Rxns	96 Rxns
Blue	PCR Buffer Mix ¹	260 µl	1	2	4
Purple	Primers & Probes ²	135 µl	1	2	4
Red	EBV Standard 1 ³	100 µl	1	1	1
Red	EBV Standard 2 ³	100 µl	1	1	1
Red	EBV Standard 3 ³	100 µl	1	1	1
Red	EBV Standard 4 ³	100 µl	1	1	1
Red	EBV Standard 5 ³	100 µl	1	1	1
Green	Internal Control ⁴	650 µl	1	1	2
White	DDW ⁵	600 µl	1	1	2

۱- بافر میکس، ۲- حاوی پرایمرها و پروب‌های ویروس اپشتین بار و کنترل داخلی، ۳- حاوی ژنوم EBV با مقادیر مشخص (جهت رسم منحنی استاندارد)، ۴- IC (Internal Control): حاوی ژنوم کنترل داخلی، ۵- DDW: آب. DNase-RNase Free

شرایط نگهداری

- کیت را تا زمان انقضا در فریز -۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری نمایید.
- از کیتی که تاریخ انقضای آن گذشته است استفاده نکنید.
- از مخلوط کردن محلول‌ها و موادی که شماره سریال (Lot Number) متفاوت دارند خودداری نمایید.
- ذوب مکرر (بیشتر از ۲ بار) اجزای کیت ممکن است بر عملکرد سنجش تأثیر بگذارد به همین منظور در ابتدا اجزای کیت را Aliquot کنید.

مواد و تجهیزات لازم

- دستگاه Real-Time PCR که دارای رنگ‌های خوانش FAM و JOE باشد.
- بلوک‌های آلومینیومی (Ice Racks) که از قبل در یخچال قرار گرفته و سرد باشند.
- سمپلرهای متغیر (0.5-10 µL و 100-10 µL)
- سر سمپلر فیلتردار DNase-RNase Free
- میکروتیوب DNase-RNase Free، 1.5 ml
- میکروتیوب‌های مخصوص PCR
- دستگاه مینی اسپین ورتکس
- کیت استخراج DNA ویروسی
- دستکش لاتکس بدون پودر

مشخصات محصول

کیت famtaQUANT EBV Real-Time PCR، یک کیت تشخیصی آزمایشگاهی مبتنی بر متد TaqMan Probe بوده، که به منظور تشخیص و تعیین میزان DNA اختصاصی ویروس اپشتین بار تولید گردیده است. تست دارای یک سیستم تکثیر هترولوگ (تکثیر ژن کنترل داخلی) جهت تعیین احتمال وجود ممانعت کننده‌های PCR و همچنین صحت عملکرد محلول‌های کیت می‌باشد. پروب اختصاصی DNA ویروس اپشتین بار با رنگ FAM (کانال سبز) و پروب اختصاصی ژن کنترل داخلی (IC) با رنگ JOE (کانال زرد) نشان دار شده است. استفاده از پروب‌های متصل شده به رنگ‌های متفاوت، امکان تشخیص همزمان DNA اختصاصی ویروس اپشتین بار و کنترل داخلی را به دستگاه Real-Time PCR می‌دهد.

دستگاه‌های Real-Time PCR

دستگاه‌های Real-Time PCR که دارای رنگ‌های خوانش FAM و JOE باشند، جهت استفاده با کیت حاضر مناسب هستند. در دستگاه ABI 7500 رنگ‌های التراناتیو JOE، HEX یا VIC می‌باشند.

نمونه و شرایط نگهداری آن

- نمونه مناسب جهت انجام آزمون کمی EBV، خون کامل بیمار است.
- نمونه خون بیمار باید در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شده و نمونه‌ی جدا شده تا زمان استخراج در فریزر -۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شود.
- پیشنهاد می‌شود قبل از فریز کردن، نمونه‌ی خون را در دو حجم 200 µL جهت انجام تست و احیاناً تکرار آن، و یک حجم 1000 µL جهت Backup، در میکروتیوب‌های 1.5 mL DNase-Free RNase Free جداسازی نمایید.
- به هیچ وجه از خون حاوی هپارین و EDTA در غلظت‌های بالا استفاده نشود.

احتیاط‌ها و هشدارها

- این کیت در مصارف تشخیصی کاربرد دارد. استاندارد به نتایج این کیت بدون استفاده از سایر داده‌های بالینی، آزمایشگاهی و پاراکلینیکی توصیه نمی‌شود.
- رعایت اقدامات ایمنی عمومی در هنگام کار با نمونه‌های عفونی، محلول‌ها و ریجنت‌ها الزامیست.
- قبل از انجام آزمون سطوح کاری را به وسیله‌ی وایتکس ۱۰٪ و سپس الکل ۷۰٪ ضدعفونی نمایید.
- سپس به مدت حداقل ۲۰ دقیقه لامپ UV هود و یا Workstation را روشن نموده تا فضای زیر آن ضد عفونی گردد.
- مقررات کار با نمونه‌های عفونی باید بر اساس رعایت اصول صحیح آزمایشگاهی (GLP) انجام گیرد.
- جهت جلوگیری از بروز آلودگی حین کار (Carry over contamination) استفاده از مکان‌های مجزا جهت آماده‌سازی و انجام واکنش ضروری است.
- هرگز درب ویال‌های تکثیر شده را باز نکنید. بعد از اتمام آزمون فوراً ویال‌های تکثیر شده را از دستگاه Real-Time PCR خارج نموده و در ظرف محتوی هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ قرار داده و نسبت به اتوکلاو آن اقدام و در فضایی خارج از آزمایشگاه معدوم نمایید.
- چنانچه نمونه‌های آزمایشگاه شما به تعداد کافی نمی‌باشند، به محض دریافت کیت آن را در حجم‌های کمتر Aliquot کرده و تا زمان استفاده، در فریزر و دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

روش استخراج ژنوم

نمونه‌ی خون را از فریزر خارج کرده و اجازه دهید تا در دمای اتاق ذوب شود. سپس آن را مدت کوتاهی ورتکس و اسپین نمایید. سپس مقدار 200 µL از خون بیمار را در یک میکروتیوب 1.5 mL ریخته و با استفاده از کیت و یا دستگاه‌های استخراج اتوماتیک، DNA ویروس را از نمونه استخراج نمایید.

کیت‌های استخراج QIAamp DNA Blood mini Kit یا QIAamp DSP Virus Spin Kit (کمپانی کیاژن) جهت استخراج DNA ویروس اپشتین بار توصیه می‌گردند.

توجه: برای اطمینان از صحت نتایج منفی Viral Load بیمار، ارزیابی عدم حضور ممانعت کننده‌های واکنش PCR و اطمینان از کیفیت استخراج، 12 µL از کنترل داخلی (IC) را در هنگام استخراج به Lysate (مخلوط بافر لیز کننده و خون)، بعد از مرحله انکوباسیون و قبل از مرحله‌ی اضافه کردن اتانول در استخراج اضافه نمایید.

- هرگز نمونه کنترل داخلی را مستقیماً به خون اضافه نکنید.
 - در هر آزمون یک نمونه منفی را نیز جهت کنترل، استخراج کنید.
 - بهتر است حجم Elution Buffer نهایی 60 µL باشد.
 - DNA استخراج شده را می‌توان تا زمان انجام آزمایش در فریزر -۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری نمود.
- توجه:** اگر حجم نمونه و یا Elution Buffer نهایی را تغییر دادید حتماً با کارشناسان فنی شرکت تماس بگیرید.

آماده‌سازی واکنش

تهیه مستر میکس

بر اساس تعداد واکنش‌هایی که می‌خواهید انجام دهید ویال‌های کیت شامل PCR Buffer Mix، Primers & Probes، استاندارد‌ها (S1، S2، S3، S4، S5)، Internal Control و DDW را از فریزر خارج کرده و اجازه دهید تا بر روی Ice Rack به تدریج ذوب شوند و پس از اطمینان از ذوب شدن، ویال‌ها را به طور مختصر ورتکس و سپس اسپین نموده و بر اساس جداول زیر نسبت به تهیه مستر میکس اقدام کنید.

تهیه مستر میکس به دو صورت انجام می‌شود

اگر کنترل داخلی جهت اطمینان از عدم حضور ممانعت کننده های PCR بکار می‌رود، مستر میکس را بر اساس جدول 2 تهیه نمایید.

جدول (۲) آماده سازی میکس PCR به همراه کنترل داخلی

Number of Reactions (rxns)	1
PCR Buffer Mix	10 µL
Primers & Probes	5 µL
Internal Control	2 µL
Master Mix Volume	17 µL

اگر کنترل داخلی جهت کنترل مرحله استخراج و اطمینان از عدم حضور ممانعت کننده های PCR بکار می‌رود، ژنوم کنترل داخلی میبایست در هنگام استخراج اسید نوکلئیک به نمونه خون اضافه شده باشد (قبلا در قسمت استخراج ژنوم توضیح داده شد). در این صورت مستر میکس را بر اساس جدول ۳ تهیه نمایید.

جدول (۳) آماده سازی میکس PCR بدون کنترل داخلی

Number of Reactions (rxns)	1
PCR buffer Mix	10 µL
Primers & Probes	5 µL
Master Mix Volume	15 µL

اضافه کردن الگو

- مستر میکس آماده شده را به کمک پیتینگ و یا ورتکس آرام، هموژن و سپس اسپین نمایید.
- مقدار 15 µL از مستر میکس تهیه شده را به میکرو تیوب های مخصوص PCR که بر روی بلوک الومینیومی سرد شده (Ice Rack) قرار دارند اضافه نمایید.
- مقدار 10 µL از DNA استخراج شده (برای بیماران)، همچنین از هریک از استاندارد ها را در میکروتیوب های مربوطه اضافه نموده و حداقل ۲ بار و به آرامی پیتینگ نمایید.
- نکته: برای جلوگیری از آلودگی حین کار به ترتیب لوله NTC، نمونه‌های بیماران و سپس لوله های استاندارد را آماده نمایید.
- سپس بلوک الومینیومی سرد (Ice Rack) را به اتاقی که دستگاه Real-Time PCR قرار دارد منتقل کنید.

تنظیم برنامه دستگاه

- رنگ فلورسنت جهت گزارشگر FAM, EBV (Reporter) و رنگ فلورسنت جهت گزارشگر (Reporter) کنترل داخلی، JOE است.
- نکته: بهتر است برنامه دمایی قبل از آماده کردن مستر میکس و اضافه کردن الگو، تنظیم گردد.

برنامه دمایی برای آزمون Real-Time PCR

جدول (۴) برنامه ی دمایی

	Temperature	Hold	Acquisition	Cycle
Initial denaturation and polymerase activation	95°C	15 min	-----	1X
Denaturation	95°C	20 sec	-----	45X
Annealing and elongation	60°C	40 sec	yes	

تنظیمات اختصاصی دستگاه Rotorgene جهت بهینه سازی خوانش:

Gain optimization

Optimize Acquiring → perform optimization before 1st Acquisition

وارد کردن غلظت استاندارد ها در نرم افزار دستگاه

غلظت استانداردها را بر اساس ستون ۱ و یا ستون ۲ جدول ۵ در نرم افزار دستگاه تنظیم کنید. توصیه می شود که اعداد استاندارد ها را بر اساس ستون دوم تنظیم نمایید.

جدول (۵) غلظت و بال های استاندارد

Quantification Standards	Column 1 Concentration [IU/µl]	Column 2 Concentration [IU/ml]
Standard 1	1,000,000	300,000,000
Standard 2	100,000	30,000,000
Standard 3	10,000	3,000,000
Standard 4	1000	300,000
Standard 5	100	30,000

تفسیر نتایج (Result Interpretation)

نمونه های مثبت و استاندارد های کیت باید منحنی تکثیر سیگموتیدی را نشان دهند. هر نمونه که منحنی تکثیر را نشان بدهد به عنوان مثبت در نظر گرفته می‌شود.

- در صورتیکه نمونه بیمار دارای منحنی سیگموتیدی بوده و Ct کمتر از ۴۰ داشته باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن جهت تکثیر کنترل داخلی، مثبت تلقی می‌شود.
- در صورتیکه نمونه بیمار فاقد منحنی تکثیر برای EBV بوده ولی دارای منحنی تکثیر برای کنترل داخلی باشد این نمونه منفی در نظر گرفته می‌شود.
- اختلاف قابل توجه Ct کنترل داخلی یک نمونه نسبت به سایر نمونه ها و بالا رفتن نمودار کنترل داخلی برای نمونه‌ای که لود ویروسی پایینی دارد را می توان ناشی از لود ویروسی نامناسب آن نمونه دانست. در این صورت تکرار استخراج آن نمونه پیشنهاد می‌گردد.
- در صورتیکه نمونه بیمار فاقد منحنی تکثیر برای هر دو رنگ خوانش FAM و JOE باشد، استخراج یا آزمایش آن نمونه میبایست تکرار شود.
- توجه: دقت نمایید که شرط دارا بودن شکل سیگموتیدی برای تفسیر نتایج نمودار ضروری است. در دستگاه Rotor Gene Q می توانید جهت اصلاح شیب نمودار ها و مشاهده ی نمودارهای سیگموتیدی، گزینه ی Slope correction را روشن و یا خاموش نمایید.

جدول (۶) تفسیر نتایج یک آزمون

Detection Channel		Result Interpretation
FAM (EBV target)	JOE (Internal Control)	-----
Positive	Positive or Negative	Result is Positive
Negative	Positive	Target (EBV) Not Detected Result is Negative
Negative	Negative	PCR inhibition or reagent failure. Repeat test or Extraction again.

یادداشت:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

✳ برای دسترسی به دفترچه‌ی راهنما کد QR را اسکن نمایید.

این کیت براساس قوانین و مقررات گواهینامه ایزو 13458 تولید شده است.



آدرس: تهران، خیابان شریعتی، خیابان کدویی، کوچه‌ی طباطبایی، پلاک ۲

ایمیل پشتیبانی: support@famta.co

تلفن پشتیبانی: ۰۹۰۴ ۴۳۷ ۹۰۰۰

CTCGAGGACAAGGCGTTCC
AGTCCAGATGACCAA
TACCFAMTAAGA
ATGAAAGA
CTAGG