



famtaSCREEN Adenovirus Real-Time PCR Kit

کیت تشخیص مولکولی Adenovirus

به روش Real-Time PCR

راهنمای سریع

Cat Number: 2040253 (24 Reactions)
2040254 (48 Reactions)
2040255 (96 Reactions)



مقدمه

آدنوویروس‌ها گروهی از ویروس‌های DNA دار بدون پوشش هستند که می‌توانند در کودکان و بزرگسالان طیف متنوعی از عفونت‌ها را ایجاد کنند. این ویروس‌ها از عوامل شایع عفونت‌های تنفسی بوده و می‌توانند سبب بروز فارنژیت، تب، سرفه، برونشیت و پنومونی شوند. آدنوویروس همچنین در ایجاد کونژونکتیویت، کراتوکونژونکتیویت اپیدمیک و گاستروانتریت، به‌ویژه در کودکان، نقش مهمی دارد. انتقال ویروس معمولاً از طریق قطرات تنفسی، تماس مستقیم، سطوح آلوده و گاهی آب آلوده صورت می‌گیرد. این ویروس به دلیل پایداری بالا در محیط، به‌راحتی منتشر می‌شود و در برخی موارد می‌تواند به صورت نهفته در بافت‌های لنفاوی باقی بماند. در افراد دارای نقص سیستم ایمنی، مانند گیرندگان پیوند یا بیماران مبتلا به نقص ایمنی، عفونت آدنوویروسی ممکن است شدید، منتشر و تهدیدکننده حیات باشد و با عوارضی مانند پنومونی شدید، هپاتیت، درگیری گوارشی یا عفونت سیستمیک همراه شود.

محتویات کیت

جدول ۱) محتویات کیت

Color	Title	Volume per vial	24 Rxns	48 Rxns	96 Rxns
Blue	Master Mix	520 µl	1	2	4
Red	Positive Control	100 µl	1	1	1
Green	Internal Control	120 µl	1	1	2
White	DDW	600 µl	1	1	2

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

مشخصات محصول

کیت حاضر بر پایه واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی (Real-Time PCR) و با استفاده از پروب های TaqMan طراحی گردیده است. در این روش، تکثیر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی صورت می گیرد. سیگنال ناشی از این تکثیر با استفاده از رنگ های فلورسنت متصل یافته به پروب اختصاصی نمایش داده می شود. با افزایش میزان تکثیر محصول اختصاصی، شدت فلورسنت ساطع شده از پروب افزایش یافته و نتایج به شکل یک نمودار سیگموییدی در دستگاه ریل تایم روت می گردد. در این روش برخلاف روش PCR معمولی، نیازی به الکتروفورز محصول تکثیر یافته بر روی ژل آگاروز نمی باشد.

دستگاه های Real-Time PCR

دستگاه های Real-Time PCR که دارای رنگ های خوانش FAM و JOE باشند، جهت استفاده با کیت حاضر مناسب هستند. در دستگاه ABI 7500 رنگ های آلترناتیو JOE، HEX یا VIC می باشند.

نمونه و شرایط نگهداری آن

- نمونه ی مناسب جهت تشخیص Adenovirus با روش Real-Time PCR، به محل عفونت و تظاهرات بالینی بیمار بستگی دارد. در عفونت‌های تنفسی، نمونه‌های مناسب شامل سواب نازوفارنژیال، سواب حلق، آسپیره نازوفارنژیال و در موارد شدیدتر ترشحات دستگاه تنفسی تحتانی مانند BAL هستند. در موارد عفونت چشمی، سواب ملتحمة می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. در عفونت‌های گوارشی، نمونه مدفوع مناسب است و در موارد عفونت منتشر یا بیماران دچار نقص ایمنی، خون کامل، پلاسما یا سرم نیز ممکن است برای بررسی مولکولی به کار رود. انتخاب صحیح نمونه، جمع‌آوری در شرایط استریل، انتقال مناسب و نگهداری در دمای استاندارد، نقش مهمی در افزایش حساسیت و دقت آزمایش دارد. نمونه خون باید در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شده و بعد از جداسازی، بلافاصله نسبت به استخراج ژنوم اقدام گردد.
- در صورتی که امکان استخراج ژنوم فراهم نباشد نمونه باید تا زمان استخراج در فریزر ۲۴- درجه سانتیگراد نگهداری شود.
- پیشنهاد می‌شود قبل از فریز کردن، نمونه ی بیمار را در دو حجم 200 µL جهت انجام تست و احیاناً تکرار آن، و یک حجم 1000 µL جهت Backup، در میکروتیوب های 1.5 mL DNase- RNase Free جداسازی نمایید.
- به هیچ وجه از خون حاوی هپارین و EDTA در غلظت های بالا استفاده نشود.

احتیاط ها و هشدار ها

- این کیت در مصارف تشخیصی کاربرد دارد. استناد به نتایج این کیت بدون استفاده از سایر داده های بالینی، آزمایشگاهی و پاراکلینیکی توصیه نمی شود.
- رعایت اقدامات ایمنی عمومی در هنگام کار با نمونه های عفونی، محلول ها و ریجنتها الزامیست.
- قبل از انجام آزمون سطوح کاری را به وسیله ی 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 نمونه های عفونی باید بر اساس رعایت اصول صحیح آزمایشگاهی (GLP) انجام گیرد.
- جهت جلوگیری از بروز آلودگی حین کار (Carry over contamination) استفاده از مکان های مجزا جهت آماده سازی و انجام واکنش ضروری است.
- هرگز درب ویال های تکثیر شده را باز نکنید. بعد از اتمام آزمون فوراً ویال های 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 نمونه های آزمایشگاه شما به تعداد کافی نمیباشند، به محض دریافت کیت آن را در حجم های کمتر Aliquot کرده و تا زمان استفاده، در فریزر و دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

روش استخراج ژنوم

نمونه 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 نمونه ی بیمار را در یک میکروتیوب 1.5 mL ریخته و با استفاده از کیت و یا دستگاه های استخراج اتوماتیک، DNA را از نمونه استخراج نمایید. در هر آزمون یک نمونه منفی را نیز جهت کنترل، استخراج کنید. تا زمان انجام آزمایش می توان DNA استخراج شده را در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهدار نمود.

آماده سازی واکنش

تهیه مستر میکس

بر اساس تعداد واکنش هایی که میخواهید انجام دهید ویال های کیت شامل Master Mix، Positive Control، 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، ویال ها را به طور مختصر ورتکس و سپس اسپین نموده و بر اساس جدول ۲ تهیه نمایید.

جدول ۲) آماده سازی میکس

Number of Reactions (rxns)	1
Master Mix	20 µL
Internal Control	2 µL
Master Mix Volume	22µL

اضافه کردن الگو

- مستر میکس آماده شده را به کمک پیتینگ و یا ورتکس آرام، هموژن و سپس اسپین نمایید.
 - مقدار 20 µL از مستر میکس تهیه شده را به میکرو تیوب های مخصوص PCR که بر روی بلوک آلومینیومی سرد شده (Ice Rack) قرار دارند اضافه نمایید.
 - مقدار 5 µL از DNA استخراج شده (برای بیماران)، همچنین کنترل مثبت و NTC 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 ی کنترل مثبت را آماده نمایید.

- سپس بلوک آلومینیومی سرد (Ice Rack) را به اتاقی که دستگاه Real-Time PCR قرار دارد منتقل کنید.

تنظیم برنامه دستگاه

- رنگ فلورسنت جهت گزارشگر (Reporter) FAM, Adenovirus 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	-----	40X
Annealing and elongation	64°C	30 sec	yes	

تنظیمات اختصاصی دستگاه Rotorgene جهت بهینه سازی خوانش:

Gain optimization

Optimize Acquiring → perform optimization before 1st Acquisition

تفسیر نتایج (Result Interpretation)

در نرم افزار دستگاه Rotorgene Q منوی Analysis گزینه Quantitation را انتخاب کرده و روی Cycling A. Green کلیک کنید و Threshold را روی 0.05 قرار دهید. سپس روی Yellow Cycling A. کلیک کرده و Threshold را روی 0.05 قرار دهید.

از نوار بالای پنجره ی Quantitation Analysis، گزینه های Dynamic Tube و Slope Correct را روشن نموده و گزینه ی Outlier Removal (جهت مماس کردن نمودار NTC با خط صفر) را در بازه ی ۱ تا ۱۰ درصد تنظیم نمایید.

فلورسنت سبز (Green) مربوط به Adenovirus و فلورسنت زرد (Yellow) مربوط به کنترل داخلی (IC) می باشد.

در صورتیکه نمونه در کانال سبز دارای منحنی سیگموئیدی بوده و Ct آن کمتر از ۳۲ باشد و در کانال زرد دارای منحنی سیگموئیدی و Ct آن ۲۰ تا ۳۰ باشد، نمونه مثبت می باشد.

در صورتیکه نمونه در کانال سبز فاقد منحنی سیگموئیدی باشد و در کانال زرد دارای منحنی سیگموئیدی بوده و Ct آن بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، نمونه منفی می باشد.

در صورتیکه نمونه در کانال سبز و زرد فاقد منحنی سیگموئیدی باشد استخراج باید تکرار شود.

توجه: دقت نمایید که شرط دارا بودن شکل سیگموئیدی برای تفسیر نتایج نمودار ضروری است. در دستگاه Rotor Gene Q می توانید جهت اصلاح شیب نمودار ها و مشاهده ی نمودارهای سیگموئیدی، گزینه ی Slope correction را روشن و یا خاموش نمایید.

جدول ۵ تفسیر نتایج یک آزمون

Detection Channel		Result Interpretation
FAM (Adenovirus target)	JOE (Internal Control)	-----
Positive	Positive or Negative	Adenovirus DNA detected
Negative	Positive	Adenovirus not detected. The sample is negative
Negative	Negative	PCR inhibition or reagent failure. Repeat test or Extraction again.

مداخله گر ها (Interference)

با توجه به تست های انجام شده بر روی تکرارهای سه تایی از نمونه هایی که دارای مواد مداخله گر احتمالی در فرایند آزمون Real-Time PCR می باشند، نتایج نشان می دهد که مواد مداخله گر به میزان اعلام شده در جدول زیر اثر مهارکنندگی بر روی تست ندارند. استفاده از نمونه هایی که دارای مقادیر بیشتر از اعداد اعلام شده در جدول زیر باشند، توصیه نمی شود.

جدول ۶ مواد مداخله کننده

ماده مداخله کننده و غلظت آن
هموگلوبین ۲۰ گرم بر دسی لیتر
با غلظت ۱.۸ میلی گرم بر میلی لیتر EDTA
سیترات سدیم ۰.۰۱ مولار
تری گلیسرید ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر
آلبومین با غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر
بیلی روبین ۰.۶ میلی گرم بر دسی لیتر
هپارین ۰.۰۵ واحد بر میلی لیتر
سدیم کلرید ۱۵۰ میلی مولار
ایزوپروپانول ۵ درصد حجمی/حجمی

پایداری (Stability)

دمای نگهداری کیت حاضر ۲۰- درجه سانتی گراد می باشد. در صورت نگهداری کیت در دمای ذکرشده، محتویات کیت تا حداقل ۱۲ ماه پایدار می باشند. جهت حفظ پایداری بهینه، اکیدا توصیه می شود نگهداری کیت مطابق با شرایط اعلام شده در دفترچه صورت پذیرد. در غیر این صورت، جهت راهنمایی بیشتر لطفا با کارشناسان ما تماس حاصل فرمایید.

یادداشت:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

✳ برای دسترسی به دفترچه ی راهنما کد QR را اسکن نمایید.

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



آدرس: تهران، خیابان شریعتی، خیابان کدویی، کوچه ی طباطبایی، پلاک ۲

ایمیل پشتیبانی: support@famta.co

تلفن پشتیبانی: ۰۹۰۴ ۴۳۷ ۹۰۰۰

CCCTCGAGGACAAAGGCGTTTC
GCAGTCCAGATGACCAA
CTACCCFAMTAAGAC
AATGAAAGAT
CTAGGA