

Code: FAMTA.MA.IN.01

Rev: 05-00

Date: 1405/05



دفترچه راهنما

*famta*SCREEN Adenovirus Real-Time PCR Kit

کیت تشخیص مولکولی Adenovirus

به روش Real-Time PCR

Version 05-00



Cat. No:

2040253 (24 Reactions)

2040254 (48 Reactions)

2040255 (96 Reactions)

CCCTCGAGGACAAGGCGTT
CAGTCCAGATGACCA
TACCTAG
AATGAAAGA
ACCTAG
CT



info@famta.co
www.famta.co



0939-188 3994
02122004254-5

صفحه	عنوان
۲.....	کاربرد
۲.....	مقدمه
۲.....	اساس آزمایش
۳.....	محتویات کیت
۳.....	مواد و تجهیزات لازم
۴.....	دستگاه های سازگار با کیت
۴.....	شرایط نگهداری کیت
۴.....	نمونه و شرایط نگهداری آن
۴.....	احتیاط ها و هشدار ها
۵.....	استخراج ژنوم
۵.....	آماده سازی واکنش
۶.....	اضافه کردن الگو
۷.....	تنظیم برنامه دستگاه
۷.....	تفسیر نتایج
۸.....	مداخله گر ها
۸.....	پایداری
۹.....	عبث یابی
۱۰.....	پشتیبانی

کاربرد

این کیت جهت شناسایی و تشخیص مولکولی Adenovirus طراحی گردیده است.

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، به راحتی 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.

اساس آزمایش

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 می‌گیرد. سیگنال ناشی از این تکثیر با استفاده از رنگ های فلورسنت متصل یافته به پروب اختصاصی نمایش داده می‌شود. 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 رویت می‌گردد. در این روش برخلاف روش PCR معمولی، نیازی به الکتروفورز محصول تکثیر یافته بر روی ژل آگاروز نمی‌باشد.

محتویات کیت

این کیت شامل یک راهنمای سریع به صورت کاغذی و موارد زیر به عنوان اجزاء تشکیل دهنده کیت می‌باشد.

جدول ۱) محتویات کیت

Color	Title	Volume per vial	No. of vials 24 Reactions	No. of vials 48 Reactions	No. of vials 96 Reactions
Blue	Master Mix	520 µl	1	2	4
Green	Internal Control	120 µl	1	1	2
Red	Positive Control	50 µl	1	1	2
White	DDW	600 µl	1	1	2

۱. میکس اصلی حاوی بافر، آنزیم، پرایمرها و پروب های ژن هدف و کنترل داخلی

۲. حاوی ژنوم کنترل داخلی

۳. حاوی ژنوم Adenovirus

۴. آب DNase-RNase Free

مواد و تجهیزات لازم

- ✓ دستگاه Real-Time PCR که دارای رنگ های خوانش FAM و JOE باشد.
- ✓ هود زیستی کلاس II و Workstation
- ✓ بلوک های آلومینیومی (Ice Racks) که از قبل در یخچال قرار گرفته و سرد باشند.
- ✓ سمپلر های متغیر (0.5-10 µL و 10-100 µL)
- ✓ سر سمپلر فیلتردار DNase-RNase Free
- ✓ میکروتیوب 1.5 ml، DNase-RNase Free
- ✓ میکروتیوب های مخصوص PCR
- ✓ دستگاه مینی اسپین ورتکس
- ✓ کیت استخراج DNA ویروسی
- ✓ دستکش لاتکس بدون پودر
- ✓ روپوش های آزمایشگاهی
- ✓ خودکار علامت گذاری

دستگاه های سازگار با کیت

این کیت بر روی دستگاه ریل تایم پی سی آر Rotor-Gene Q شرکت QIAGEN ارزیابی شده است و در تمامی دستگاه های Real time PCR که دارای دو کانال خوانش سبز (رنگ FAM) و زرد (رنگ JOE) باشند قابل استفاده است.

شرایط نگهداری کیت

کیت را تا زمان انقضا که بر روی کیت درج شده است در فریز ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمایید. از مخلوط کردن محلولها و موادی که شماره سریال (Lot Number) متفاوت دارند خودداری نمایید و از کیتی که تاریخ انقضای آن گذشته است استفاده نکنید. کیت به همراه یخ خشک ارسال می شود. دقت کنید که اجزای کیت پس از دریافت منجمد بوده و از نظر ظاهری نیز سالم باشند.

ذوب مکرر (بیشتر از ۳ بار) اجزای کیت ممکن است بر عملکرد سنجش تاثیر بگذارد به همین منظور در ابتدا، اجزای کیت را تقسیم (Aliquot) کنید.

در صورت نگهداری کیت مطابق با شرایط فوق، ترکیبات آن به مدت ۱۲ ماه پایدار خواهند بود.

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 عفونت های تنفسی، نمونه های مناسب شامل سواب نازوفارنژیال، سواب حلق، آسپیره نازوفارنژیال و در موارد شدیدتر ترشحات دستگاه تنفسی تحتانی مانند BAL هستند. در موارد عفونت چشمی، سواب ملتحمه می تواند مورد استفاده قرار گیرد. در عفونت های 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

صحيح نمونه، جمع آوری 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 می شود 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 میکروتیوب های 1.5 mL DNase-RNase Free جداسازی نمایید.

به هیچ وجه از نمونه حاوی هپارین و EDTA در غلظت های بالا استفاده نشود.

نمونه هایی که به صورت زیر باشند، کیفیت لازم جهت استفاده برای تست Adenovirus را دارا نمی باشند:

- ۱- نمونه هایی که خون آنها همولیز شده باشد.
- ۲- نمونه هایی که در اطراف لوله نمونه گیری لکه های خون مشاهده گردد.
- ۳- نمونه هایی که بیش از دو ساعت در دمای محیط نگهداری شده باشند.
- ۴- نمونه هایی که بیش از ۱۲ ساعت در دمای یخچال نگهداری شوند.
- ۵- نمونه هایی که بیش از ۲ سال در دمای ۲۰- نگهداری شده باشد.

احتیاط ها و هشدارها

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 دستکش لاتکس بدون پودر پوشیده و با استفاده از یک گاز استریل آغشته به وایتکس ۱۰٪ سطوح کاری را تمیز و ضد عفونی نمایید. در پایان دستکش و گاز استریل را دور انداخته و دستکش جدیدی پوشیده و با گاز استریل آغشته به الکل ۷۰٪ سطوح کاری را کاملاً پاک و ضد عفونی نمایید. سپس به مدت حداقل ۲۰ دقیقه لامپ UV هود و یا Workstation را روشن نموده تا فضای زیر آن ضد عفونی گردد.

استفاده از کیت باید توسط افرادی که آشنایی کامل با اصول و روش های تشخیص مولکولی Real-Time PCR همچنین توانایی آنالیز و تفسیر داده ها را داشته باشند، انجام پذیرد.

به دلیل حضور پروب های دارای فلورسنت در ویال مستر میکس، از تماس نور مستقیم با مخلوط واکنش جلوگیری نمایید و تمامی مراحل آماده سازی و انجام مراحل تست را در شرایط بدون نور انجام دهید.

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.

از سه اتاق مجزا برای عملیات هایی نظیر استخراج نمونه، آماده سازی واکنش ها و فرایند تکثیر استفاده کنید. تست را دقیقاً مطابق با پروتکل ارائه شده در دفترچه ی راهنما کیت انجام دهید. از تغییر دادن حجم واکنش خودداری نمایید، زیرا سبب کاهش حساسیت کیت می گردد.

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.
- DNA استخراج شده را می توان تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود

آماده سازی واکنش

از کالیبره بودن سمپلرها قبل از آماده سازی واکنش اطمینان حاصل نمایید. بر اساس تعداد واکنش هایی که میخواهید انجام دهید ویال های کیت شامل Master Mix، Positive 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 نمایید.

جهت اطمینان از نتایج به دست آمده از نمونه ها تست را به صورت دوتایی (Duplicate) ران نمایید. اینکار به خصوص در مورد نمونه هایی که به طور نامناسب استخراج شده باشند و یا اگر DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار نباشد، ضروری است. برای هر ران کاری حتماً از هر دو کنترل مثبت، و منفی استفاده نمایید و بر اساس جدول زیر نسبت به تهیه مستر میکس اقدام کنید.

جدول ۲) آماده سازی میکس PCR

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

اضافه کردن الگو

مستر میکس را به کمک پیتینگ و یا ورتکس آرام، هموژن و سپس اسپین نمایید. مقدار 20 μL از مستر میکس را به میکروتیوب ها 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 را در میکروتیوب های مربوطه اضافه کنید.

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.

نکته: بهتر است برنامه دمایی قبل از آماده کردن مستر میکس و اضافه کردن الگو، تنظیم گردد.

تنظیم برنامه دستگاه

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 آلترا تئو JOE ، HEX یا VIC می باشند. در انتخاب دتکتورها دقت کنید.

رنگ فلورسنت جهت گزارشگر Adenovirus (Reporter) FAM، و رنگ فلورسنت جهت گزارشگر (Reporter) JOE می باشد.

برنامه دمایی برای آزمون Real-Time PCR

جدول ۳) برنامه 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	Green, Yellow	

تنظیمات اختصاصی دستگاه Rotorgene Q جهت بهینه سازی خوانش:

Gain optimization:

Optimize Acquiring → perform optimization before 1st Acquisition

تفسیر نتایج

در نرم افزار دستگاه Rotorgene Q از منوی Analysis گزینه Quantitation را انتخاب کرده و روی Cycling A. Green کلیک کنید و Threshold را روی 0.05 قرار دهید. سپس روی Cycling A. Yellow 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: نمونه‌ی کنترل مثبت فاقد ژنوم کنترل داخلی بوده و منحنی سیگموئیدی در کانال زرد مربوط به این نمونه مشاهده نمی‌گردد.

توجه: دقت نمایید که شرط دارا بودن شکل سیگموئیدی برای تفسیر نتایج نمودار ضروری است. در دستگاه RotorGene Q می‌توانید جهت اصلاح شیب نمودار ها و مشاهده‌ی نمودارهای سیگموئیدی، گزینه‌ی Slope correction را روشن و یا خاموش نمایید.

جدول ۴) 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
EDTA با غلظت ۱.۸ میلی گرم بر میلی لیتر
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 ذکر شده، 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.

عیب یابی (Troubleshooting)

در صورتی که هیچ سیگنالی در میکروتیوب مربوط به کنترل مثبت خوانده نشود:
علل احتمالی:

- نمونه ی کنترل مثبت به تیوب مربوطه اضافه نشده است.
- کانال های انتخاب شده مطابق با SOP نمی باشند.
- پروفایل دمایی انتخاب شده مطابق با SOP نمی باشد.
- میکس نکردن و یا میکس ناکافی نمونه ی کنترل مثبت.
- رعایت نشدن شرایط نگهداری یکی یا بیشتر اجزاء کیت و یا اتمام تاریخ اعتبار کیت

راه حل:

- آزمون را دوبار تکرار کرده، کنترل مثبت را به آرامی ورتکس و سپس اسپین نموده و عمل پیپتینگ را به درستی انجام دهید.

دریافت منحنی تکثیر در نمونه NTC و NC جهت توالی هدف (Adenovirus):

علل احتمالی:

- آلودگی در فضای کار و یا ریجنت های کیت اتفاق افتاده است.

راه حل:

- فضای کار، سمپلر ها و ... را مطابق SOP مربوطه تمیز کرده و لامپ های UV زیر ورک استیشن ها و اتاق را به مدت حداقل ۲۰ دقیقه روشن نمایید، ریجنت های آلوده شده را دور ریخته و از ریجنت های جدید استفاده کنید.

یادداشت:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

همکار گرامی:

در صورت هر گونه سوال و اشکال با کارشناسان شرکت فمتا تماس حاصل فرمایید.

شماره تلفن پشتیبانی: ۰۹۰۴ ۴۷۳ ۹۰۰۰

ایمیل پشتیبانی: support@famta.co