Poliovirus rRT-PCRITD 5.0 Kit

اختبار الهوية للتمييز بين سلالات شلل الأطفال باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل الاصدار الخامس

حقيبة الأدوات لتحري التمييز بين سلالات فيروس شلل الأطفال بدعم من المبادرة العالمية لاستئصال شلل الأطفال

مكونات الحقيبة (Kit Components):

علبة واحدة فيها 6 أنابيب صغيرة تحتوي علي البادئات الممهدة (primers) والمجسات (probes)، وهذه الأنابيب هي: (أنبوبة رباعية تحتوي علي اربعة كواشف: الفيروسات المعوية + السلالات الثلاث لفيروس شلل الأطفال سابين Quadruplex EV+Sabin)، وأنبوبة خاصة بعموم فيروسات شلل الأطفال (PanPV)، وأنبوبة خاصة للسلالة 1 من الفيروس الشرس لشلل الأطفال (WPV1)، وأنبوبة خاصة للسلالة 2 من فيروس شلل الأطفال (PV Type 2)، وأنبوبة خاصة للسلالة I-3 لفيروس شلل الأطفال الشرس (WPV3-I)، وأنبوبة خاصة للسلالة II-3 لفيروس شلل الأطفال الشرس (WPV3-II)، كما تتضمن العلبة أيضًا 3 أنابيب خاصة بالمحددات الإيجابية، و7 أنابيب من الماء، ونسخة واحدة من هذه النشرة مرفقة معها. والمحددات الإيجابية هي أحماض نووية محضَّرة بالتَّجْفيد (التجفيف والتجميد) (lyophilized) ولا تسبب العدوى، ويمكن استخدام المحدد الأيجابي الخاص بالفيروس سابين (Sabin) لفحص كل من رباعية الفيروسات المعوية + السلالات الثلاث لفيروس شلل الأطفال سابين (Quadruplex EV+Sabin) وعموم فيروسات شلل الأطفال (PanPV) و السلالة 2 من فيروس شلل الأطفال (PV Type 2).

والكواشف والإنزيمات الإضافية والضرورية والتي لا تتضمنها حقيبة الأدوات هي:

Quanta Biosciences qScript XLT One-Step RT-qPCR ToughMix (CAT#95132-500) or
Promega GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (CAT#A6120).

مع الاعتبار ان ما تم ذكره في هذه النشرة من الكواشف والإنزيمات الإضافية هو ما تم استخدامه في تطوير وتقييم هذه المجموعة من البادئات الممهدة (primers) والمجسات (probes) ولا يُعَدّ اعتمادًا نوعيًا لها.

وقد يتفاوت توافر الكواشف والإنزيمات الإضافية بين شركة منتجة وأخرى، ويتحمَّل كل مختبر مسؤولية العثور على البدائل الملائمة عند الضرورة.

تفاعل التناسخ العكسي-البلمرة المتسلسل في وقت محدد (Real-Time RT-PCR Reactions)

1- املأ ورقة عمل تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بكتابة الاسم، والتاريخ، والبادئات الممهدة (primers) والمجسات (probes)، وأرقام العينات وترتيبها، والرموز التعريفية لكل من جهاز المدور الحراري thermocycler والبرنامج الحاسوبي الخاصين بالتفاعل.
   (أ) استخدم البرنامج الحاسوبي للمدور الحراري لتسمية أماكن العينات وذلك لكل من العَيّنات والمحددات الايجابية والسلبية
   (ب) تعيين محدد ايجابي واحد من الحمض النووي والخاص بكل سلالة والغير معدي المتوفر ضمن مكونات الحقيبة (Poliovirus rRT-PCRITD 5.0 Kit)

2- تدفئة العزلات الفيروسية الايجابية وكواشف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) في درجة حرارة الغرفة، مع الاحتفاظ بالإنزيمات الخاصة بالتفاعل في الثلج طيلة فترة التحضير لإجراء الاختبار.

3- تحضير المزيج الإنزيمي: كتابة البيانات على الأنابيب الدقيقة التي سعة كل منها 1.5 مللي لتر مدون عليه اسم كل مزيج (بادئة ممهدة /مجس) primer/probe ومرقمة بأرقام العينات، واتبع الخطوات التالية داخل كابينة خاصة بالسلامة الحيوية والبيولوجية :

   (أ) إذا كان الكاشف المستخدم هو **Promega GoTaq® Prob 1-Step RT-qPCR System** :
   امزج 10 ميكرولتر من المزيج الرئيسي GoTaqProb 1-Step Master Mix مع 1 ميكرولتر من مزيج (بادئة ممهدة /مجس) ، و 0.4 ميكرولتر من مزيج GoScript RT Mix ، و 7.6 ميكرولتر من الماء الخالي من إنزيم النيوكلياز (dH2O).ثم وزع 19 ميكرولتر من مزيج المحلول التفاعلي إلى الأنابيب التي تم تحضيرها مسبقا في الخطوة 3، ثم أضف 1 ميكرولتر من العزلات الفيروسية الايجابية (template) المطلوب اختبارها ليصبح مجمل حجم الخليط 20 ميكرولتر.
   (ب) إذا كان الكاشف المستخدم هو **Quanta ToughMix Kit**: امزج 10 ميكرولتر من ToughMix ، مع 1 ميكرولتر من مزيج (بادئة ممهدة /مجس) ، و 8 ميكرولتر من الماء الخالي من إنزيم النيوكلياز dH2O. ثم وزع 19 ميكرولتر من مزيج المحلول التفاعلي إلى الأنابيب التي تم تحضيرها مسبقا في الخطوة 3 ، ثم أضف 1 ميكرولتر من العزلات الفيروسية الايجابية (template) المطلوب اختبارها ليصبح مجمل حجم الخليط الي 20 ميكرولتر.

4- للتعامل مع أعداد كبيرة من العينات: حضِّر مزيجًا رئيسيًا لكل مجموعة من مجموعات (بادئة ممهدة /مجس) primer/probe وذلك بضرب العدد الإجمالي للعينات لتحديد الحجم المطلوب من المزيج، فعلى سبيل المثال:

(أ) إذا كان الكاشف **Promega GoTaq® Prob 1-Step RT-qPCR System**، وكان عدد العينات 10، اضرب 10 (وهو عدد العينات) في 10 ميكرولتر من المزيج الرئيسي GoTaqProb 1-Step Master Mix ، فيكون الناتج 100 ميكرولتر منه، واضرب 10 في 0.4 من مزيج GoScript RT Mix، فيكون الناتج 4 ميكرولتر منه، واضرب 10 في مع 1 ميكرولتر من مزيج (بادئة ممهدة /مجس) primer/probe ، فيكون الناتج 10 ميكرولتر ، واضرب 10 في 7.6 ميكرولتر من ماء خالٍ من إنزيم النيوكلياز dH2O ، فيكون الناتج 76 ميكرولتر. ثم وزع 19 ميكرولتر من مزيج المحلول التفاعلي إلى الأنابيب التي تم تحضيرها

(ب) إذا كانت حقيبة الأدوات **Quanta ToughMix Kit:** اضرب 10 (وهو عدد العينات) في 10 ميكرولتر من ToughMix ، فيكون الناتج 100 ميكرولتر ، واضرب 10 في 1 ميكرولتر من مزيج (بادئة ممهدة /مجس) primer/probe ، فيكون الناتج 10 ميكرولتر ، واضرب 10 في 8 ميكرولتر من الماء الخالي من إنزيم النيوكلياز dH2O، فيكون الناتج 80 ميكرولتر ، ثم وزع 19 ميكرولتر من مزيج المحلول التفاعلي إلى الأنابيب التي تم تحضيرها

5- تحضير العينات: خذ العينة (الايجابية العزل علي الخلايا الحية) وضعها في أنبوبة طارد مركزي دقيقة، واستخدم طارد مركزي (Tube-Strip PicoFuge) لتدوير (centrifuge) العينة في الأنبوب الدقيق بدرجة حرارة الغرفة وبسرعة 5000 دورة في الدقيقة (وبحد أقصى 6400 دورة في الدقيقة) ولمدة دقيقتين. **(وعندما يتم تدوير العينة spun يمكن حفظها في درجة حرارة 20^0C- لإعادة استعمالها عند اللزوم، ويجب اعادة تدويرها مرة ثانية re-spin بعد حفظها في درجة حرارة 20^0C-).**

6- خذ من السائل الطافي (الطبقة العلوية) من كل عينة 1 ميكرولتر (أو 1 ميكرولتر من المحدد الأيجابي- Control RNA) وأضفه إلى أنبوبة التفاعل الملائمة. ان تفاعل التناسخ العكسي-البلمرة المتسلسل في وقت محدد (Real-Time RT-PCR Reactions) لا يحتاج التسخين عند درجة حرارة 95^0C . ويمكن استخدام 1 ميكرولتر من الحمض النووي المستخلص (extracted RNA) ، إلا أن ذلك عمومًا غير مطلوب.

7- ضع الأنابيب في جهاز المدور الحراري (Thermocycler Machine)واختر ملف التشغيل استنادًا إلى نوع الجهاز المستخدم.

ملاحظة: عند استخدام الجهاز ذي المسار (ABI7500) تجنب اختيار المسار (7500 السريع(من بين الخصائص المتاحة في التجارب، وذلك للحصول على مسار أقل سرعة.

أ- تفاعل التناسخ العكسي RT : درجة حرارة 50^0C لمدة 30 دقيقة.

ب- تعطيل التناسخ العكسي RT : درجة حرارة 95^0C لمدة دقيقة واحدة.

CFX96 (BloRad) & Mx3000P (Agilent/Stratagene)		
دورات تفاعل التناسخ العكسي- البلمرة المتسلسل PCR (40X)	95^0C	15 ثانية
	50^0C	45 ثانية
	72^0C	5 ثواني

7500 & 7500 Fast (Applied Biosystems)		
دورات تفاعل التناسخ العكسي- البلمرة المتسلسل PCR (40X)	95^0C	15 ثانية
	50^0C	45 ثانية
	سرعة ramp %25	
	72^0C	5 ثواني

Rotor-Gene Q (Qiagen)		
دورات تفاعل التناسخ العكسي- البلمرة المتسلسل PCR (40X)	95^0C	15 ثانية
	50^0C	45 ثانية
	61^0C	20 ثانية
	72^0C	5 ثواني

ج- عين جمع البيانات الفلورية لنقطة النهاية في نهاية خطوة التبريد بعد التسخين عند 50^0C درجة مئوية.

د- عليك أن تختار المرشِّح الملائم للصبغات بما يتلاءم مع الأختبار الذي تجريه، وستجد أدناه جدول بكل المعلومات حول ذلك.

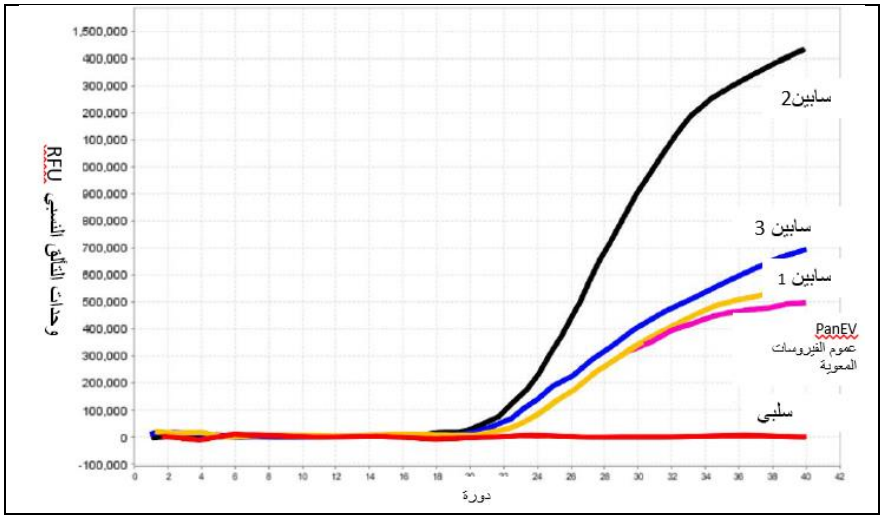
ه- ابدأ تشغيل الجهاز

تفسير النتائج

للتحقق من صحة البيانات التي حصلت عليها، عليك أولًا أن تتحقق من المحددات السلبية والإيجابية. والعينة الإيجابية هي التي تظهر عليها علامة لا مجال للبس والغموض فيها وتفوق قيمة المحدد السلبي، وهي علامة تظهر على نحو نمطي بشكل منحنى شبيه بحرف S (انظر الأمثلة في ما يلي). وليس هناك قيمة قاطعة ل Ct وينبغي مقارنة جميع علامات تكبير العينة بالمحدد السلبي.

العينات التي لها قيمة Ct تساوي أو تزيد عن 37 هي علامة خلفية للاختبار ولكن علي اي حال ينبغي تقييمها وفقًا للمحدد السلبي.

وفي ما يلي مثال عن العلامات الايجابية على جهاز CFX96 BioRad.



أعطال - أخطاء شائعة

المشكلة	الأسباب المحتملة
جميع التفاعلات سلبية، بما فيها المحدد الإيجابي.	نقص في المكونات، خطأ في الملف الحراري المستخدم في المدور الحراري، أو كواشف سيئة.
لا وجود لقيمة C_t (قيمة سلبية) للمحدد الإيجابي؛ وبعض تفاعلات العينات إيجابية.	تكسير الحمض النووي للمحدد الايجابي أو لم تتم إضافته أصلًا.
قيم إيجابية ل C_t مع واحد أو أكثر من أزواج السلالات الثلاث لفيروس شلل الأطفال سابين ولكن قيمة فيروس شلل الأطفال PanPV سلبية.	تأكد من أن التبريد بعد التسخين في تفاعل التناسخ العكسي-البلمرة المتسلسل على إنزيم التناسخ العكسي وصل إلى درجة حرارة 50^0C، وتأكد من أن الوقت الذي اقتضاه المسار بين 50^0C و 72^0C استغرق 40-45 ثانية (بمعدل $0.4\ ^0C$ / ثانية) في اجهزة ABI 7500
الفشل في اختيار المرّشح الصبغي الصحيح في الاختبار.	إن ABI 7500/CFX96/Mx3000 سيسجل جميع الأصبغة بغض النظر عن الصبغ الذي تم اختياره، وعليك أن تختار المُرَشِّح الصحيح للصبغ وأن تعيد تحليل النتائج.
عدم تجميع البيانات الفلورية في كل أو في بعض العينات.	وجود فقاعات في العينات (أو في الغطاء). منعت تفاعل التناسخ العكسي-البلمرة المتسلسل، خفِّف العينة بالنسب التالية 1:2 أو 1:5 أو 1:10 وذلك استنادًا إلى نتائج قيم C_t.
تفاعل إيجابي (قيمة C_t) في البادئات الممهدة (primers) ، لعموم فيروسات شلل الأطفال PanPV إلا أن جميع الأزواج الأخرى سلبية. أو إذا كانت النتائج لاتزال غير متسقة بعد إعادة الاختبارة مرة أخرى.	يجب إحالة العينة غير متسقة النتيجة إلى مختبر مرجعي متخصص للتعرف على هويتها.

المجسات (probes) والمُرَشِّحات (filters) في تفاعل التناسخ العكسي-البلمرة المتسلسل

اسم الاختبار أو الفحص	المجس	المُرَشِّح
Quadruplex + EV رباعية (الفيروسات المعوية + السلالات الثلاث لفيروس شلل الأطفال سابين)	سابين 1 Sabin 1	CY5
Quadruplex + EV رباعية (الفيروسات المعوية + السلالات الثلاث لفيروس شلل الأطفال سابين)	سابين 2 Sabin 2	FAM
Quadruplex + EV رباعية (الفيروسات المعوية + السلالات الثلاث لفيروس شلل الأطفال سابين)	سابين 3 Sabin 3	ROX
Quadruplex + EV رباعية (الفيروسات المعوية + السلالات الثلاث لفيروس شلل الأطفال سابين)	عموم الفيروسات المعوية Pan-EV	VIC
Pan Poliovirus عموم فيروسات شلل الأطفال	PanPV عموم فيروسات شلل الأطفال	FAM
WPV1 السلالة 1 من الفيروس الشرس لشلل الأطفال	WPV1 السلالة 1 من الفيروس الشرس لشلل الأطفال	FAM
Poliovirus type 2 السلالة 2 من فيروس شلل الأطفال	PV Type 2 السلالة 2 من فيروس شلل الأطفال	FAM
WPV3-I (AFRO WPV3) السلالة 3-I من الفيروس الشرس لشلل الأطفال	WPV3 السلالة 3 من الفيروس الشرس لشلل الأطفال	CY5
WPV3-II (SOAS WPV3) السلالة 3-II من الفيروس الشرس لشلل الأطفال	WPV3 السلالة 3 من الفيروس الشرس لشلل الأطفال	FAM

تحضير المحدد الايجابي (lyophilized RNA) لاستخدامه في تفاعل التناسخ العكسي-البلمرة المتسلسل

يجب اعادة تشكيل المحددات الإيجابية قبل البدء في استخدامها، وعليك أن تدوّر الأنبوب لفترة وجيزة لتركيز الحبيبات المُجَفَّدة (المجففة بالتبريد) قبل إعادة تشكيل المستعلق، وينبغي اعادة تشكيل كل محدد مُجَفَّد (مُجَفَّف بالتجميد) في 100 ميكرولتر من الماء الخالي من إنزيم النيوكلياز (dH2O) (المتوافر ضمن حقيبة الأدوات)، وبعد إضافة الماء الخالي من إنزيم النيوكلياز dH2O ضع المحددات المحلولة في درجة حرارة 20^0C- طيلة الليل لإتاحة الوقت لهدرجة حُبَيْبات RNA في الماء، ثم يقسم المحلول إلى أحجام أصغر وتُحفظ في درجة حرارة 20^0C- لاستعمالها في المستقبل. تقسيم المحلول لأحجام صغيرة يحد ويقلص فرص مخاطر التلوث بين انبوبة واخري وايضا فرصة تكسير RNA.

ويمكن استخدام المحدد الإيجابي للسابين في كمحدد ايجابي في فحص : الفيروسات المعوية + السلالات الثلاث لفيروس شلل الأطفال سابين Quadruplex + EV وفي عموم فيروسات شلل الأطفال PanPV، وفي السلالة 2 من فيروس شلل الأطفال PV Type2

محتويات حقيبة الأدوات لتحري التمييز بين سلالات فيروس شلل الأطفال Poliovirus rRT-PCRITD 5.0 Kit
(تكفي لإجراء 100 تفاعل)

وصف الأنبوب	الحجم	لون الغطاء	العدد في الحقيبة (العلبة)
مجسات/بادئات ممهدة لرباعية (الفيروسات المعوية + السلالات الثلاث لفيروس شلل الأطفال سابين) Quadruplex EV + Sabin	100 ميكرولتر	أصفر	1
المحدد الإيجابي RNA لفيروس سابين/السلالة 2 من فيروس شلل الأطفال	*	برتقالي	1
مجسات/بادئات ممهدة لعموم فيروسات شلل الأطفال	100 ميكرولتر	أبيض	1
مجسات/بادئات ممهدة للفيروس الشرس السلالة 1	100 ميكرولتر	أزرق	1
المحدد الإيجابي RNA للفيروس الشرس السلالة 1	*	أزرق فاتح	1
مجسات/بادئات ممهدة للسلالة 2 من فيروسات شلل الأطفال	100 ميكرولتر	بلون البط	1
مجسات /بادئات ممهدة للفيروس الشرس السلالة 3-I (AFRO WPV3)	100 ميكرولتر	بنفسجي	1
مجسات /بادئات ممهدة للفيروس الشرس السلالة 3- II (SOAS WPV3)	100 ميكرولتر	أخضر	1
المحدد الإيجابيRNA للفيروس الشرس السلالة 3	*	بنفسجي فاتح	1
ماء معقم خالٍ من إنزيم تكسير الحمض النووي	100 ميكرولتر	بلا لون	7

*مُجَفَّد (مُجَفَّف بالتجميد) وليس سائلًا

النتيجة الصحيحة للتمييز بين سلالات الفيروس	النتيجة النهائية	العمل
أي فحص للسلالة 2 من فيروس شلل الأطفال (سابين 2 أو السلالة 2)	السلالة 2 من فيروس شلل الأطفال (PV2)	إحالة للتعرف على التسلسل الجيني والتحقق من صحة النتائج
سابين 1	SL1 فيروس سابين 1	إحالة لاختبار VDVP1
سابين 3	SL3 فيروس سابين 3	إحالة لاختبار VDVP3
السلالة 1 من الفيروس الشرس لشلل الأطفال	NSL1 فيروس شرس 1	إحالة للتعرف على التسلسل الجيني والتحقق من صحة النتائج
أي فيروس من السلالة 3 من الفيروسات الشرسة (I أو II أو كلاهما)	NSL3 فيروس شرس 3	إحالة للتعرف على التسلسل الجيني والتحقق من صحة النتائج
عموم الفيروسات المعوية وعموم فيروسات شلل الأطفال (وجميع الفحوص الأخرى سلبية)	غير محدد	إحالة للتعرف على التسلسل الجيني والتحقق من صحة النتائج
نتائج غير منطقية (مثل إيجابية عموم فيروسات شلل الأطفال، وسلبية عموم الفيروسات المعوية)	غير صحيح	أعد الفحص مرة أخرى مع إحالة للتعرف على التسلسل الجيني والتحقق من صحة النتائج
جميع الفحوص سلبية	فيروسات ليست معوية (NEV)	نتيجة نهائية
عموم الفيروسات المعوية (وجميع المقايسات الأخرى سلبية)	فيروسات معوية ليست فيروسات شلل الأطفال (NPEV)	نتيجة نهائية

References

1. Kilpatrick, D. R., K. Ching, J. Iber, R. Campagnoli, C.J. Freeman, N.Mishrik, H. Liu, , M. A. Pallansch, and O. M. Kew. 2004. Multiplex PCR Method for Identifying Recombinant Vaccine-related Polioviruses. J. Clin. Microbiol. 42:4313-4315.

2. Kilpatrick, D. R., C. F. Yang, K. Ching, A. Vincent, J. Iber, R. Campagnoli, M. Mandelbaum, L. De, A. Nix, and O. M. Kew. 2009. Rapid Group, Serotype and Vaccine Strain-Specific Identification of Poliovirus Isolates by Real-Time Reverse Transcription-PCR Using Degenerate Primers and Probes Containing Deoxyinosine Residues. J. Clin. Microbiol. 47(6): 1939-1941.

3. Kilpatrick, D.R., K. Ching, J. Iber, Q. Chen, S.-J. Yang, L. De, A.J. Williams, M. Mandelbaum, H. Sun, M. Steven Oberste, and O. M. Kew. 2014. Identification of vaccine-derived polioviruses using dual-stage real-time RT-PCR. J. Virological Methods 197:25– 28.

4. Kilpatrick, D. R., B. Nottay, C. F. Yang, S. J. Yang, M. N. Mulders, B. P. Holloway, M. A. Pallansch, and O. M. Kew. 1996. Group-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residue at positions of codon degeneracy. J. Clin. Microbiol. 34:2990-6.

5. Kilpatrick, D. R., B. Nottay, C. F. Yang, S. J. Yang, E. Da Silva, S. Penaranda, M. Pallansch, and O. Kew. 1998. Serotype-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. J. Clin. Microbiol. 36:352-7.

6. Yang, C.-F., L. De, B.P. Holloway, M.A. Pallansch, and O.M. Kew. 1991. Detection and identification of vaccine-related polioviruses by the polymerase chain reaction. Virus Res. 20:159-179.

7. Yang, C.-F., L. De, S.-J. Yang, J. Ruiz Gómez, J. Ramiro Cruz, B. P. Holloway, M. A. Pallansch, and O. M. Kew. 1992. Genotype-specific in vitro amplification of sequences of the wild type 3 polioviruses from Mexico and Guatemala. Virus Res. 24:277-296.

8. Expanded Programme on Immunization. 2000. Molecular characterization of polioviruses (laboratory manual). World Health Organization, Geneva

توزيع المركز المتعاون مع منظمة الصحة العالمية المعني بالفيروسات المعوية وفيروسات شلل الأطفال (WHO Collaborating Centre for Enteroviruses and Polioviruses)، مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها: [1600 Clifton Road NE, Mailstop G-10, Atlanta, Georgia 30333 USA]

الهاتف: 2396-639-404-1+

الفاكس: .4011-639-404-1+

للاتصال بمراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها: Everardo Vega

البريد الإلكتروني : EVega@cdc.gov

Steve Oberste

البريد الإلكتروني : SOberste@cdc.gov

يقتصر استخدام هذه النشرة لأغراض البحوث فقط.

هذه النشرة غير مخصصة للإجراءات التشخيصية.

أيار/مايو 2017