

50% از این بیماران تب خفیف، درد در مفاصل و عضلات نیز مشاهده می شود. عفونت شدید و مزمن با ویروس هپاتیت B می تواند باعث بروز نارسایی کبد شود که ممکن است منجر به مرگ بیمار گردد. اگرچه بیشتر افراد از عفونت حاد بهبود می یابند، برخی از افراد مبتلا به هپاتیت B مزمن به بیماری های کبدی همچون سیروز و کارسینوم کبدی (سرطان کبد) مبتلا می شوند.

کیت BehDx HBV Real Time PCR بر مبنای روش Real-Time PCR و همچنین استفاده از تکنیک TaqMan به منظور شناسایی انواع ژنوتیپ های ویروس هپاتیت B (A-H) از نمونه های EDTA-پلازما طراحی و عرضه شده است.

4. حیطه کاربری

کیت BehDx HBV Real Time PCR یک تست با کاربرد تحقیقاتی است که بر مبنای روش Real Time PCR و همچنین استفاده از تکنیک TaqMan طراحی شده است. کیت حاضر توانایی شناسایی کیفی انواع ژنوتیپ های ویروس هپاتیت B (A-H) از نمونه های EDTA-پلازما را دارا می باشد.

5. نکات مهم : لطفا قبل از استفاده مطالعه شود.

- قبل از شروع فرایند تمامی ریجنت ها بایستی در دمای محیط قرار گیرند تا ذوب شوند.
- زمان ذوب شدن ریجنت ها بیش از 30 دقیقه نباشد تا از تخریب مواد جلوگیری شود.
- پس از ذوب ریجنت ها، همگن و میکروفیوژ شوند.
- کلیه مراحل بایستی بر روی بلوک سرد انجام گیرد.
- از میکروتیوب های DNase & RNase free و تیپ های فیلتردار DNase & RNase free استفاده شود.

6. تجهیزات و مواد لازم که در کیت فراهم نشده است

- دستگاه های Real-Time PCR سازگار (به بخش 8 دستگاه های سازگار مراجعه شود)
- کیت ها و یا دستگاه های استخراج DNA ویروسی مناسب (به بخش 10-1 استخراج DNA مراجعه شود)
- دستگاه سانتریفیوژ و میکروواسپین
- میکروتیوب PCR و تیپ های فیلتر دار DNase & RNase free
- دستکش بدون پودر یک بار مصرف

7. نمونه های قابل استفاده

- پلازما جمع آوری شده در تیوب های حاوی EDTA و یا سیترات
- نگه داری نمونه ها تا قبل از استخراج DNA بایستی در دمای 2-8 درجه سانتی گراد و نهایتا به مدت 24 ساعت و در صورتی که شرایط

1. محتویات کیت

CAT.NO	محتویات	HBV (24RXN)	HBV (48RXN)	HBV (96RXN)	رنگ درب تیوب
BD127	HBV Mix 1	1×300 µl	2×300 µl	4×300 µl	آبی
BD128	HBV Mix 2	1×60 µl	2×60 µl	4×60 µl	قهوه ای
BD129	HBV Internal Control	1×200 µl	1×400 µl	2×400 µl	سفید
BD413	HBV Positive Control	1×80 µl	1×160 µl	2×160 µl	قرمز
BD130	HBV Negative Control	1×80 µl	1×160 µl	1×320 µl	سبز

2. شرایط پایداری و نگهداری

- حمل کیت بایستی در شرایط دمای -20°C و در حداقل زمان ممکن صورت گیرد.
- پس از دریافت کیت، محتویات بایستی مطابق شرایط درج شده بر روی جعبه کیت نگه داری شوند.
- در صورت نگه داری کیت در دمای نامناسب در حین حمل از آن استفاده نشود.
- در صورت سالم نبودن بسته بندی کیت و یا عدم تطابق شکل ظاهری مواد مصرفی با توضیحات از آن استفاده نشود.
- کیت را در دمای ثابت نگه داری نموده و از نور خورشید محافظت کنید.
- از تکرار متعدد چرخه انجماد / ذوب بپرهیزید.
- در صورت باز نشدن مواد مصرفی و نگه داری در دمای توصیه شده این محصول تا پایان تاریخ انقضای مندرج بر روی جعبه کیت پایدار خواهد ماند.

3. معرفی

ویروس هپاتیت B (HBV) یکی از اعضای خانواده هپادناویریده (Hepadnaviridae) است. ویروس هپاتیت B دارای ژنوم حلقوی است که از DNA تقریباً دو رشته ای تشکیل شده است؛ ولی همانندسازی آن از طریق RNA واسطه صورت می گیرد. ویروس هپاتیت B از طریق خون، فرآورده های خونی و سایر مایعات بدن منتقل می شود. علائم اولیه ی عفونت شامل زردی پوست و چشم ها، خستگی شدید، تیرگی ادرار، از دست دادن اشتها، حالت تهوع و استفراغ و درد های شکمی است که می توانند برای چند هفته دوام داشته باشند. تقریباً در 20-

- تمامی محتویات کیت پس از استفاده جزء دسته ی زباله های زیستی خطرناک می باشد و باید به درستی دفع شود.

10. فرآیند (دستورالعمل استفاده)

1-10. استخراج DNA

برای جداسازی DNA استفاده از کیت های زیر توصیه می شود :

1. BehPrep G-Plus DNA Extraction Kit (Cat Number: BP101)
2. BehPrep Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Cat Number: BPVD050)
3. BehMag Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Cat Number: BM202)

استخراج DNA توسط کیت و دستگاه های استخراج با کیفیت و خلوص کافی نیز مورد تایید است.

2-10. کنترل داخلی

کیت BehDx HBV Real Time PCR شامل یک ویال کنترل داخلی (IC) است که به منظور کنترل احتمال وجود مهارکننده های PCR و نظارت بر روش جداسازی DNA مورد استفاده قرار می گیرد. اگر می خواهید از کنترل داخلی منحصرراً برای بررسی مهار PCR استفاده کنید، باید مستقیماً به Master Mix اضافه شود. در صورتی که از کنترل داخلی برای نظارت بر روش جداسازی DNA و بررسی احتمال مهار PCR استفاده شود، بایستی در مرحله استخراج، کنترل داخلی را به میزان 10 درصد از حجم بافر الوشن در مرحله لایز اضافه کنید، به عنوان مثال اگر حجم مورد استفاده بافر الوشن در مرحله استخراج 60 µl باشد، به مقدار 6 µl از IC برای هر نمونه به میکس بافر لایز کننده و نمونه اضافه شود.

توجه : کنترل داخلی را مستقیماً به نمونه اضافه نکنید. کنترل داخلی باید فقط به مخلوط بافر لایز کننده و نمونه یا مستقیماً به بافر لایز کننده اضافه شود.

3-10. آماده سازی مسترمیکس

1. برای تهیه مستر میکس، 12.5 µl از HBV Mix 1 و 2.5 µl از HBV Mix 2 برای هر نمونه به لوله اصلی واکنش اضافه نمایید.
- در صورتی که کنترل داخلی در مرحله استخراج اضافه شده باشد، لطفاً مطابق برنامه حجمی مندرج در جدول زیر تیوب ها را آماده کنید.

Number of Reactions	1	15
HBV Mix 1	12.5 µl	187.5 µl
HBV Mix 2	2.5 µl	37.5 µl
Total	15 µl	225 µl

استخراج و یا انتقال نمونه در طی 24 ساعت اولیه فراهم نبود، نگه داری نمونه ها در دمای 20- تا 80- درجه سانتی گراد صورت گیرد. **توجه:** استفاده از هپارین به عنوان ضد انعقاد در فرایند PCR اختلال ایجاد می کند، به همین دلیل از لوله های حاوی هپارین استفاده نشود. همچنین نمونه بیمارانی که هپارین مصرف می کنند برای PCR مناسب نیست.

8. دستگاه های سازگار

کیت برای استفاده در دستگاه های PCR زیر توسعه و اعتبارسنجی شد.

- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
 - Mic qPCR cyclers (Bio Molecular Systems)
 - Tianlong Real-Time PCR systems (Xi'an Tianlong Science and Technology)
 - QuantStudio™ 5 Pro Real-Time PCR System
 - CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
 - CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
 - LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- توجه:** این کیت برای استفاده در دستگاه های بدون نیاز به ROX طراحی گردیده است.

9. نکات ایمنی

- از جا به جایی و یا ترکیب ریجنت های کیت با Lot Number مختلف جدا خودداری کنید.
- برای جلوگیری از انتقال آلودگی به محلول مسترمیکس، بلافاصله پس از دریافت کیت، تیوب های کنترل مثبت، منفی و تیوب کنترل داخلی را در فریزر مجزا از تیوب حاوی مسترمیکس قرار دهید.
- از کیت و یا اجزای کیت بعد از گذشت تاریخ انقضا استفاده نشود.
- این محصول توسط افراد متخصص و آموزش دیده در زمینه تست های مولکولی قابل استفاده می باشد، هنگام کار از گان آزمایشگاهی و دستکش یکبار مصرف استفاده کنید.
- در هنگام استفاده از ریجنت های کیت توصیه می شود از دستکش های بدون پودر استفاده شود.
- تمامی نمونه ها می توانند باعث انتقال آلودگی شوند و بایستی در حمل و استفاده از آن ها دقت شود. از تماس مستقیم با نمونه ها خودداری شود. لوازم و موادی که با نمونه ها در ارتباط بوده بایستی به درستی ضدعفونی و اتوکلاو شوند.
- از تماس نمونه یا ریجنت ها با پوست، چشم و غشاهای مخاطی خودداری کنید. در صورت تماس با پوست، چشم یا غشاهای مخاطی ، فوراً با آب بشویید و سریعاً به پزشک مراجعه کنید.

- در صورتی که کنترل داخلی در مرحله PCR اضافه شود ، بایستی مطابق جدول زیر کنترل داخلی مستقیماً به Master Mix اضافه شود.

Number of Reactions	1	15
HBV Mix 1	12.5 µl	187.5 µl
HBV Mix 2	2.5 µl	37.5 µl
HBV Internal Control	1 µl	15 µl
Total	16 µl	240 µl

2. میکروتیوب را ابتدا ورتکس و سپس برای مدت کوتاهی میکروپیوژ نمایید.

4-10. آماده سازی واکنش PCR

1. 15 µl از مسترمیکس تهیه شده در مرحله قبل به تیوب های PCR اضافه گردد.
2. به هر تیوب تست 10 µl از DNA استخراج شده بیمار یا 10 µl از کنترل ها (کنترل مثبت یا منفی) اضافه گردد.
3. میکس نمونه و مسترمیکس ، و همچنین کنترل و مسترمیکس کاملاً همگن و میکروپیوژ گردد.
- پیشنهاد می شود تمام این مراحل بر روی یخ یا بلوک سرد انجام شود.

Reaction setup	
Master Mix	15 µl
Sample or Control	10 µl
Total	25 µl

5-10. برنامه دمایی

- تیوب ها را در دستگاه قرار داده و مطابق برنامه زیر تست را انجام دهید.

program	Temperature [°C]	Hold [hh:mm:ss]	Cycles	Analysis Mode
Activation	95	00:03:00	1	None
Amplification	95	00:00:10	45	Quantification
	60*	00:00:30		

* خوانش در دما 60 ° C انجام می گیرد و کانال های FAM و HEX بایستی روشن شوند .

سیگنال FAM (سبز) نشان دهنده وضعیت ژن HBV و سیگنال HEX (زرد) نشان دهنده وضعیت ژن کنترل داخلی می باشد.

11. تفسیر نتایج

1. نمودارهای مثبت بایستی به صورت کاملاً سیگموئیدی باشند و نمودارهایی که شکل سیگموئیدی ندارند می بایستی به عنوان منفی در نظر گرفته شوند .
 2. خط آستانه (threshold) بر اساس نمونه مثبت و یا کنترل مثبت تعیین شود.
- نتایج به دست آمده بر اساس جدول زیر تفسیر شود.

کانال		تفسیر
FAM	HEX	
+	+/-	• ویروس HBV شناسایی شده است. • در صورتی که در کانال HEX منحنی برای نمونه مشاهده نشود ولی در کانال FAM منحنی مشاهده شود نمونه مثبت در نظر گرفته می شود.
-	+	• ویروس HBV شناسایی نشده است. • نمونه شامل مقدار قابل شناسایی از DNA ویروسی نمی باشد.
-	-	• وجود مهارکننده در واکنش PCR • انجام ناصحیح مراحل فرایند تست و آماده سازی واکنش، تست از مرحله استخراج یا PCR تکرار شود.

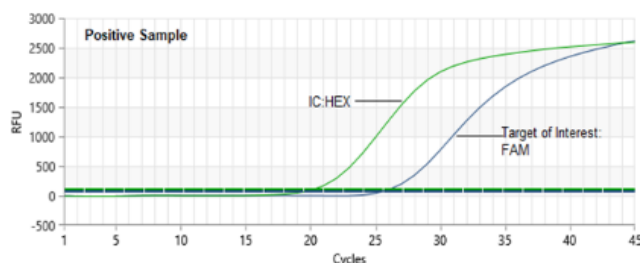


Figure1. -Positive Sample

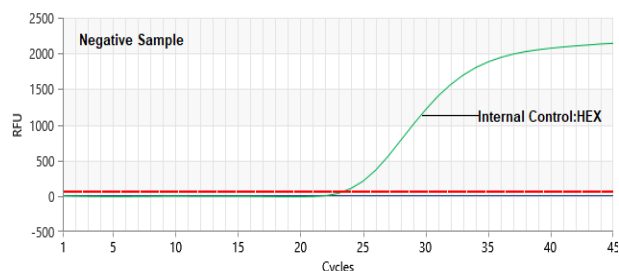


Figure2-Negative Sample

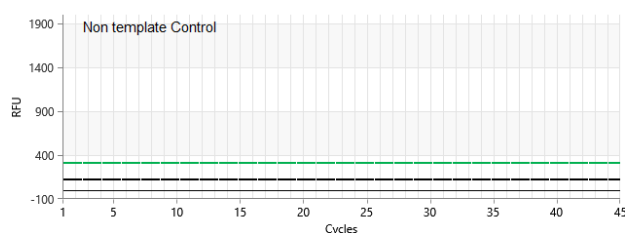


Figure3.Non-Template Control

12. حساسیت تحلیلی:

حساسیت تحلیلی کیت حاضر با تجزیه و تحلیل سری رقت پلاسמיד HBV تعیین شده است. حساسیت تحلیلی برای تشخیص DNA اختصاصی ویروس HBV، برابر با $1 \text{ IU}/\mu\text{l}$ می باشد.

13. اختصاصیت تحلیلی:

اختصاصیت تحلیلی پرایمرها و پروب های کیت BehDx HBV Real Time PCR ابتدا با استفاده از مطالعات دقیق بیوانفورماتیکی بررسی شدند تا اطمینان حاصل شود که توانایی شناسایی همه ژنوتیپ های HBV مربوطه را دارا می باشند. علاوه بر این اختصاصیت تحلیلی پرایمرها و پروب ها با نمونه های منفی نیز تایید شد. نمونه های منفی هیچ سیگنالی با پرایمرها و پروب HBV ایجاد نمی کنند.

همچنین هنگام آزمایش نمونه های DNA و RNA میکروارگانیسم های مختلف که امکان یافت شدن آن ها در خون وجود دارد، هیچ واکنش متقابلی با این پاتوژن ها مشاهده نشد. این پاتوژن ها شامل:

- Cytomegalovirus (CMV)
- Epstein-Barr virus (EBV)
- Hepatitis C virus (HCV)
- Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
- Herpes simplex virus 2 (HSV-2)
- Varicella-zoster virus
- JC virus
- BK virus

مفهوم	نماد	مفهوم	نماد
محدودیت دفاعی		کاربرد تحقیقاتی	
تعداد تست		اطلاعات کارخانه	
تاریخ انقضا		تاریخ تولید	
مخاطرات زیستی		از تابش نور دور نگه داشته شود	
حاوی دستورالعمل استفاده از محصول		احتیاط	
کد کالا		شماره سری ساخت	