

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 20-50% 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 quantitative 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) و تعیین میزان کمی این ویروس در نمونه های EDTA-پلازما طراحی و عرضه شده است.

4. حیطه کاربری

کیت BehDx HBV quantitative 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 انواع ژنوتیپ های ویروس هپاتیت B (A-H) و تعیین میزان کمی ویروس هپاتیت B در نمونه های EDTA-پلازما را دارا می باشد.

5. نکات مهم : لطفاً 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 10-11 استخراج DNA مراجعه شود)
- دستگاه سانتریفیوژ و میکروواسپین
- میکروتیوب PCR و تیپ های فیلتر دار DNase & RNase free
- دستکش بدون پودر یک بار مصرف

1. محتویات کیت

CAT.NO	محتویات	HBV (24RXN)	HBV (48RXN)	HBV (96RXN)	رنگ درب تیوب
BD127	HBV Mix 1	1x300 µl	2x300 µl	4x300 µl	آبی
BD128	HBV Mix 2	1x60 µl	2x60 µl	4x60 µl	قهوه ای
BD129	HBV Internal Control	1x200 µl	1x400 µl	2x400 µl	سفید
BD414	HBV QS1 (1x10 ⁴ IU / µl)	1x50 µl	2x50 µl	4x50 µl	قرمز
BD415	HBV QS2 (1x10 ³ IU / µl)	1x50 µl	2x50 µl	4x50 µl	قرمز
BD416	HBV QS3 (1x10 ² IU / µl)	1x50 µl	2x50 µl	4x50 µl	قرمز
BD417	HBV QS4 (1x10 ¹ IU / µl)	1x50 µl	2x50 µl	4x50 µl	قرمز
BD130	HBV Negative Control	1x80 µl	1x160 µl	1x320 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

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.
- 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 Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Cat Number: BPVD050)
2. BehPrep G-Plus DNA Extraction Kit (Cat Number: BP101)
استخراج دستگاهی زیر نیز توصیه می شود:
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.

10-2. کنترل داخلی

کیت BehDx HBV quantitative 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.

10-3. آماده سازی مسترمیکس

1. برای تهیه مسترمیکس، 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.

7. نمونه های قابل استفاده

- پلاسما 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 نهایتاً به مدت 24 ساعت و در صورتی که شرایط 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 cyler (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

* خوانش در دمای 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 فرآیند تست و آماده سازی واکنش، تست از مرحله استخراج یا PCR تکرار شود.

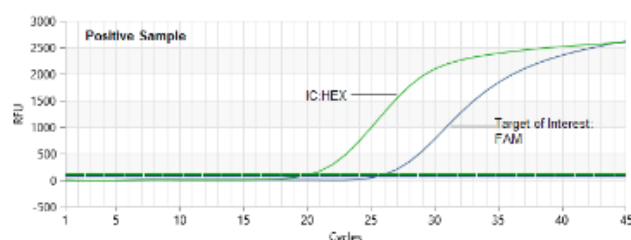


Figure1 . Positive Sample

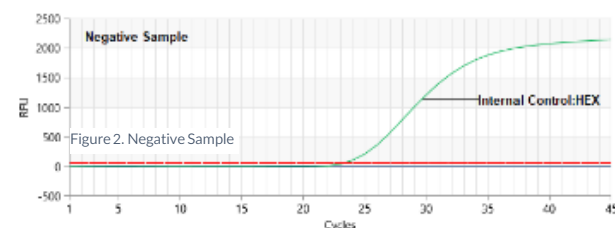


Figure 2. Negative Sample

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

- 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
Internal Control	1 μl	15 μl
Total	16 μl	240 μl

2. میکروتیوب را ابتدا ورتکس و سپس برای مدت کوتاهی میکروپیوژر 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. به 4 تیوب از واکنش 10 μl از استاندارد های شماره 1 تا 4 به ترتیب اضافه گردد.
 4. میکس نمونه و مسترمیکس ، و همچنین کنترل و مسترمیکس کاملاً همگن و میکروپیوژر گردد.
- پیشنهاد می شود تمام این مراحل بر روی یخ یا بلوک سرد انجام شود.

Reaction setup	
Master Mix	15 μl
Sample or Control (QS1-4 or Negative 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 $^{\circ}\text{C}$	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		

همچنین هنگام آزمایش نمونه‌های DNA و RNA میکروارگانیسم‌های مختلف که امکان یافت شدن آن‌ها در خون وجود دارد، هیچ واکنش متقابلی با این پاتوژن‌ها مشاهده نشد. این پاتوژن‌ها 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

نماد	مفهوم	نماد	مفهوم
	کاربرد تحقیقاتی		محدودیت دمایی
	اطلاعات کارخانه		تعداد تست
	تاریخ تولید		تاریخ انقضا
	از تابش نور دور نگه داشته شود		خطرات زیستی
	احتیاط		جای دستورالعمل استفاده از محصول
	شماره سری ساخت		کد ULS

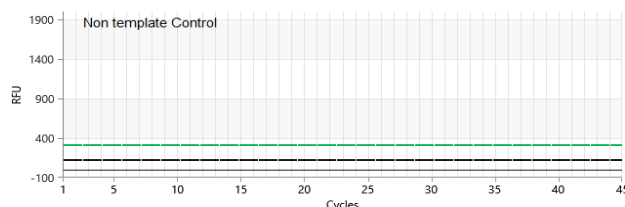


Figure 3. Non-Template Control

12. نتایج کمی:

کیفیت حاضر شامل چهار استاندارد کمی (QS) است که به منظور ایجاد یک منحنی استاندارد با غلظت‌های مناسب تعریف شوند. با استفاده از این منحنی استاندارد نمونه‌های مثبت با غلظت‌های ناشناخته را می‌توان کمی‌سازی کرد.

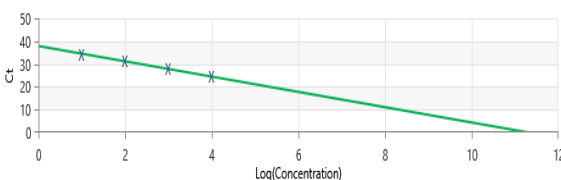
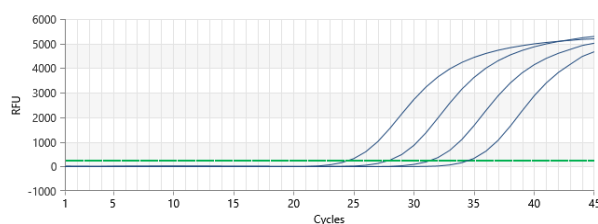


Figure 4. Standard Curve

غلظت "نمونه" بر حسب IU/μl نمایش داده می‌شود و به غلظت DNA ویروسی استخراج شده اشاره دارد. برای تعیین بار ویروسی نمونه بیمار بر حسب IU/ml، فرمول زیر باید اعمال شود:

$$\text{Viral load (Sample)} \left[\frac{\text{IU}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Volume (Eluate)} [\mu\text{l}] \times \text{Viral load (Eluate)} \left[\frac{\text{IU}}{\mu\text{l}} \right]}{\text{Sample Input [ml]}}$$

13. حساسیت تحلیلی:

حساسیت تحلیلی کیفیت حاضر با تجزیه و تحلیل سری رقت پلاسמיד HBV تعیین شده است. حساسیت تحلیلی برای تشخیص DNA اختصاصی ویروس HBV، برابر با 1 IU/μl می‌باشد.

14. اختصاصیت تحلیلی:

اختصاصیت تحلیلی پرایمرها و پروب‌های کیت BehDx HBV quantitative Real Time PCR ابتدا با استفاده از مطالعات دقیق بیوانفورماتیکی بررسی شدند تا اطمینان حاصل شود که توانایی شناسایی همه ژنوتیپ‌های HBV مربوطه را دارا می‌باشند. علاوه بر این اختصاصیت تحلیلی پرایمرها و پروب‌ها با نمونه‌های منفی نیز تایید شد. نمونه‌های منفی هیچ سیگنالی با پرایمرها و پروب HBV ایجاد نمی‌کنند.