

به عنوان یک ویروس منتقله از خون، رایج ترین روش های عفونت از طریق اقدامات تزریق نا ایمن، استریل کردن ناکافی تجهیزات پزشکی در مراکز مراقبت بهداشتی، و خون و فرآورده های خونی غربال نشده است. عفونت مزمن HCV معمولاً به آهستگی در حال پیشرفت است و اکثر بیماران بدون علامت و یا فقط علائم غیراختصاصی خفیف را نشان می دهند. پیش بینی می شود که تقریباً یک سوم افراد مبتلا به بیماری مزمن طی یک دوره 20 تا 30 ساله به سیروز کبدی یا کارسینوم سلول های کبدی مبتلا شوند. علائم مرتبط با سیروز عبارتند از: هیپاتومگالی و یا اسپلنومگالی در معاینه فیزیکی، افزایش غلظت بیلی روبین سرم و یا هیپرآلبومینمی. کیت BehDx HCV Real Time PCR جهت شناسایی حضور ژنوم ویروس هپاتیت C با استفاده از روش TaqMan Real Time PCR در پلاسما طراحی و عرضه شده است.

4. حیطه کاربری

کیت BehDx HCV Real Time PCR یک کیت کیفی آزمایشگاهی با کاربرد تحقیقاتی است که بر مبنای روش Real-Time PCR و همچنین استفاده از تکنیک TaqMan طراحی شده است. این کیت توانایی تشخیص RNA اختصاصی ویروس هپاتیت C انسانی (HCV) (ژنوتیپ های 1 تا 6) در پلاسما انسان را دارا می باشد.

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

- قبل از شروع فرآیند 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 RNA ویروسی مناسب (به بخش 10-1 استخراج RNA ویروسی مراجعه شود)
- دستگاه سانتریفیوژ و میکرواسپین
- میکروتیوب PCR و تیپ های فیلتر دار DNase & RNase free
- دستکش بدون پودر یک بار مصرف

7. نمونه های قابل استفاده

- پلاسما جمع آوری شده در تیوب های حاوی EDTA و یا سیترات
- نمونه ها تا قبل از استخراج RNA بایستی نهایتاً به مدت 24 ساعت در دما ی 2-8 درجه سانتی گراد نگه داری گردد و در

1. محتویات کیت

CAT.NO	محتویات	HCV (24RXN)	HCV (48RXN)	HCV (96RXN)	رنگ درب تیوب
BD144	HCV Mix 1	1×180 µl	2×180 µl	4×180 µl	آبی
BD145	HCV Mix 2	1×120 µl	2×120 µl	4×120 µl	قهوه ای
BD476	HCV Mix 3	1×36 µl	1×72 µl	1×144 µl	آبی
BD146	HCV RTase Enzyme	1×24 µl	2×24 µl	4×24 µl	زرد
BD181	HCV Internal Control	1×200 µl	1×400 µl	2×400 µl	سفید
BD183	HCV Positive Control	1×80 µl	1×160 µl	2×160 µl	قرمز
BD147	HCV 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 پرهیزید.
- 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

عفونت ویروس هپاتیت C یکی از علل اصلی هپاتیت مزمن، سیروز کبدی و کارسینوم کبدی (HCC) در سراسر جهان است. ویروس هپاتیت (HCV) C عضوی از خانواده Flaviviridae است که از 7 ژنوتیپ تشکیل شده است. این یک ویروس با پوشش کوچک (45 نانومتر) با ژنوم RNA تک رشته ای تقریباً 9.6 کیلوبایت است.

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 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 ريجنت 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 ريجنت 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 ضد عفونی و اتوکلاو شوند.

- از تماس نمونه یا ريجنت 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 RNA

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

1. BehPrep viral nucleic Acid Extraction Kit (Cat Number: BPVD050)

استخراج دستگاهی زیر نیز توصیه می شود:

2. BehMag Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Cat Number: BM202)

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

2-10. کنترل داخلی

کیت BehDx HCV Real Time PCR شامل یک ویال کنترل داخلی (IC) است که به منظور کنترل احتمال وجود مهارکننده های PCR و نظارت بر روش جداسازی RNA مورد استفاده قرار می گیرد. اگر می خواهید از کنترل داخلی منحصراً برای بررسی مهار PCR استفاده کنید، باید مستقیماً به Master Mix اضافه شود. در صورتی که از کنترل داخلی برای نظارت بر روش جداسازی RNA 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، 7.5 µl از HCV Mix1 و 5 µl از HCV Mix2 و 1.5 µl از HCV Mix3 و 1 µl از HCV RTase Enzyme نیز به ازای 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.

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

در این آزمون سیگنال FAM (سبز) نشان دهنده وضعیت ژن HCV 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 HCV 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 HCV شناسایی نشده است. • نمونه شامل مقدار قابل شناسایی از RNA 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.

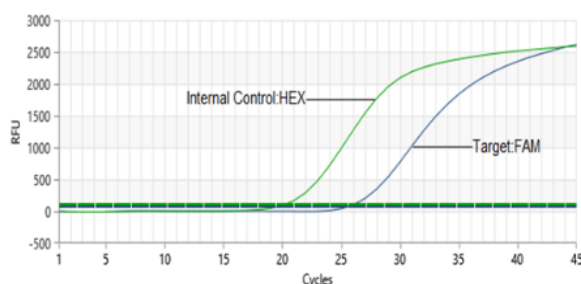


Figure 1 . Positive Sample

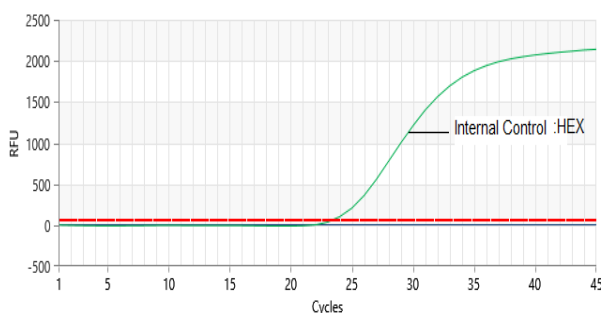


Figure 2 .Negative Sample

Number of Reactions	1	15
HCV Mix 1	7.5 µl	112.5 µl
HCV Mix 2	5 µl	75 µl
HCV Mix 3	1.5 µl	22.5 µl
HCV RTase Enzyme	1 µl	15 µl
Total	15 µl	225 µl

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

Number of Reactions	1	15
HCV Mix 1	7.5 µl	112.5 µl
HCV Mix 2	5 µl	75 µl
HCV Mix 3	1.5 µl	22.5 µl
HCV RTase enzyme	1 µl	15 µl
HCV Internal control	1 µl	15 µl
Total	16 µl	240 µl

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

4-10. آماده سازی واکنش PCR

1. 15 µl از مسترمیکس تهیه شده در مرحله قبل را به تیوب های PCR اضافه گردد.
2. به هر تیوب تست 10 µl از RNA استخراج شده بیمار یا 10 µl از کنترل ها (کنترل مثبت یا منفی) را اضافه گردد.
3. میکس نمونه و مسترمیکس ، و همچنین کنترل و مسترمیکس کاملاً همگن و میکروفیوژ 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	Cycles	Analysis Mode
Revers transcription	52	20 mins	1	None
Activation	95	3 mins	1	None
Amplification	95	10 sec	45	Quantification
	60*	30 sec		

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

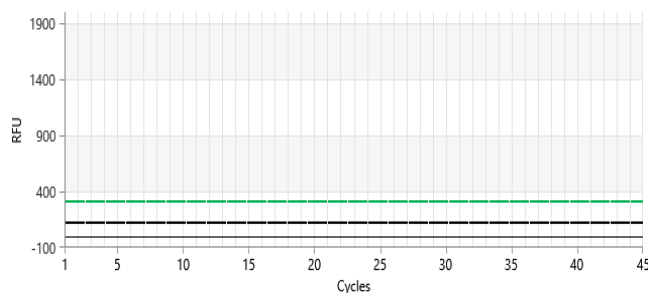


Figure 3 . Non-Template Sample

12. حساسیت تحلیلی:

حساسیت تحلیلی کیت حاضر با تجزیه و تحلیل سری رقت پلاسמיד HCV تعیین شده است که برای تشخیص RNA اختصاصی ویروس HCV، برابر با 0.5 IU/μl می باشد.

13. اختصاصیت تحلیلی:

اختصاصیت تحلیلی پرایمرها و پروب های کیت BehDx HCV Real Time PCR ابتدا با استفاده از مطالعات دقیق بیوانفورماتیکی بررسی شدند تا اطمینان حاصل شود که توانایی شناسایی همه ژنوتیپ های HCV 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 HCV ایجاد نمی کنند.

همچنین هنگام آزمایش نمونه های DNA میکروارگانیزم های مختلف که امکان یافت شدن آن ها درخون وجود دارد، هیچ واکنش متقابلی با این پاتوژن ها مشاهده نشد. این پاتوژن ها شامل:

- Hepatitis B virus (HBV)
- Epstein–Barr virus (EBV)
- Herpes simplex virus 1 (HSV–1)
- Herpes simplex virus 2 (HSV–2)
- Varicella–zoster virus
- JC virus
- BK virus
- Cytomegalovirus (CMV)