



Instruction for Use
CMV Detection RT-PCR Kit

Model: Orange Internal Control

با روش

Real-Time PCR

Cat-No: BONCMV-OR-24

Cat-No: BONCMV-OR-96



Doc. #: IFU-CMV-01 Doc. Version: 00 Revision Date 1403-10-03

فهرست مطالب

۳	شماره رفرانس
۳	شرح کیت
۳	اطلاعات پاتوژن
۵	اصول
۵	محتویات کیت
۶	نگهداری و انتقال کیت
۷	نکات احتیاط عمومی
۸	هشدارها و محدودیت‌ها
۱۰	تاریخ انقضاء کیت
۱۰	کنترل داخلی (Internal Control)
۱۱	آماده‌سازی
۱۳	برنامه‌ریزی دمایی
۱۷	آنالیز اطلاعات
۱۸	ارزیابی آنالیتیکال و کلینیکال
۲۱	نشانه‌ها
۲۱	اطلاعات تماس

- BONCMV-OR-24
- BONCMV-OR-96

شرح کیت

کیت CMV qPCR یک سیستم آماده مصرف برای تشخیص DNA ویروس CMV از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) روی ابزارهای Rotor-Gene Q است. مستر حاوی واکنش‌گرها و آنزیم‌هایی برای تکثیر اختصاصی قطعه‌ای به طول ۱۰۶ bp از ژنوم CMV بوده و برای تشخیص مستقیم امپلیکون موردنظر از طریق کانال فلورسنت Cycling Green در دستگاه‌های Rotor-Gene 3000 و Rotor-Gene 6000 طراحی گردیده است. به علاوه، این کیت حاوی سیستم ثانویه تکثیر هترولوگ برای تشخیص احتمال وجود مهارکننده واکنش PCR است. این امر از طریق شناسایی کنترل داخلی (Internal Control) در کانال فلورسنت Cycling Orange صورت می‌پذیرد.

اطلاعات پاتوژن

سیتومگالوویروس انسانی (CMV)، یک ویروس بتا هرپس از اعضای خانواده ویروس تبخال انسانی Herpesviridae است و متعلق به زیر خانواده Betaherpesvirinae می‌باشد. CMV شامل یک کپسید ۲۰ وجهی با ژنوم DNA دو رشته‌ای خطی تقریباً ۲۳۰ هزار جفت باز، یک غشا و یک پاکت خارجی است.

عفونت با CMV در همه جمعیت‌های انسانی شایع است و تقریباً ۷۰٪ یا بیشتر بزرگسالان برای آنتی‌بادی‌های CMV مثبت هستند، که نشان‌دهنده عفونت قبلی با ویروس است. شیوع CMV با افزایش سن در همه جمعیت‌ها افزایش می‌یابد.

مشابه عفونت با سایر ویروس‌های تبخال، عفونت اولیه با CMV منجر به ایجاد عفونت مداوم یا نهفته می‌شود. فعال شدن مجدد ویروس می‌تواند در پاسخ به محرک‌های مختلف، به ویژه سرکوب سیستم ایمنی رخ دهد. اکثر عفونت‌های CMV بدون علائم بالینی یا زیر بالینی هستند اما در

میزبانان دارای نقص ایمنی، مانند گیرندگان پیوند، افراد آلوده به HIV یا بیماران سرطانی، عفونت یا فعال شدن مجدد CMV ممکن است به یک بیماری انتشار یافته تهدیدکننده زندگی تبدیل شود. در زنان باردار، عفونت اولیه CMV می تواند منجر به عفونت مادرزادی جنین یا نوزاد شود.

پایش با تعیین میزان CMV در خون و پلاسما برای مدیریت مؤثر این بیماران، ایجاد تغییرات در رژیم های سرکوب سیستم ایمنی، اجرای درمان ضد ویروسی یا درمان پیشگیرانه ضروری است. پس از تشخیص، نظارت و اندازه گیری میزان CMV در خون و پلاسما برای مدیریت کارآمد و مؤثر عفونت CMV در این بیماران بسیار مهم است.

در برخی موارد، عفونت در افراد سالم می تواند باعث بیماری خفیفی شود که ممکن است شامل تب، گلودرد، خستگی، تورم غدد و گاهی موجب ایجاد مونونوکلئوز یا هپاتیت شود. افرادی که سیستم ایمنی ضعیفی دارند و به CMV مبتلا می شوند ممکن است علائم جدی تری روی چشم ها، ریه ها، کبد، مری، معده و روده ها داشته باشند. نوزادان متولد شده با CMV می توانند مشکلات مغزی، کبدی، طحال، ریه و رشد داشته باشند. شایع ترین مشکل سلامتی دراز مدت در نوزادانی که با عفونت مادرزادی CMV متولد می شوند، کاهش شنوایی است که ممکن است بلافاصله پس از تولد تشخیص داده شود یا بعداً در دوران کودکی ایجاد شود.

افراد مبتلا به CMV ممکن است ویروس را از طریق مایعات بدن مانند بزاق، ادرار، خون، اشک، مایع منی و شیر مادر منتقل کنند. CMV از طریق از تماس مستقیم با بزاق یا ادرار، به ویژه در نوزادان و کودکان خردسال، از شیر مادر، از طریق پیوند اعضای بدن و انتقال خون از فرد آلوده منتقل می شود.

از آزمایش خون می توان برای تشخیص عفونت CMV در بزرگسالانی که علائم دارند استفاده کرد. آزمایش بزاق یا ادرار برای نوزادان ترجیح داده می شود.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم پاتوژن است. در واکنش Real-time PCR محصول تکثیرشده از طریق رنگ‌های فلورسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلورسنت در حین واکنش PCR (به صورت real-time) تشخیص و تعیین مقدار دقیق محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله‌های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

محتویات کیت

Title	24 Tests	96 Tests
	Volume per Vial	Volume per Vial
CMV-Master	360 µl/tube × 1	360 µl/tube × 4
STD-1: 2×10^4 IU/µl	100 µl/tube × 1	200 µl/tube × 1
STD-2: 2×10^3 IU/µl	100 µl/tube × 1	200 µl/tube × 1
STD-3: 2×10^2 IU/µl	100 µl/tube × 1	200 µl/tube × 1
STD-4: 2×10^1 IU/µl	100 µl/tube × 1	200 µl/tube × 1
Internal Control	300 µl/tube × 1	1200 µl/tube × 1
Nuclease Free Water	250 µl/tube × 1	250 µl/tube × 1

جدول ۱. محتویات کیت

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری گردد، همچنین به‌منظور انتقال و جابه‌جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید.
 - ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
 - ✓ این کیت نیاز به حمل بر روی بسته‌های یخ‌زده (Frozen Ice Pack) را دارد.
 - ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
 - ✓ از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و در نتیجه عدم کارایی کیت می‌شود. بیش از دو بار منجمد و ذوب کردن کیت به هیچ‌وجه توصیه نمی‌گردد.
 - ✓ از قرار دادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به‌طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به‌طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.
- مواد و تجهیزات موردنیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود:

۱. کیت استخراج DNA

۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوک سمپلر فیلتردار

۳. سانتریفوژ رومیزی

۴. بلوک خنک‌کننده

۵. وایتکس ۱۰ درصد

۶. گان و دستکش

۷. دستگاه Rotor-Gene با کانال‌های فلوروسنت مخصوص Cycling Green و Cycling Orange و یا فلورفورهای A.FAM و A.Texas Red و یا هر دستگاه با قابلیت خوانش در هر ۲ کانال موردنظر
۸. نرم افزار دستگاه‌های مورد استفاده
۹. استریپ و کپ مناسب دستگاه مورد استفاده

نکات احتیاط عمومی

۱. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و در حین کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.
- ✓ لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آن‌ها جلو ببرید.
- ✓ از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
- ✓ در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
۲. از استفاده‌ی مجدد مواد یک‌بار مصرف پرهیزید.
۳. نگهداری و تخلیص نمونه‌های مثبت برای CMV، نمونه‌های گرفته‌شده از مریض، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده‌سازی Master Mix صورت پذیرد.
۴. همه مواد موردنیاز کیت قبل از شروع کار باید به‌طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.
۵. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد (به‌ویژه استانداردهای کیت) را به‌خوبی پیمپتاژ نمایید و به‌طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به‌طور کامل توصیه می‌شود.
۶. تمام مراحل مربوط به تهیه Master Mix باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به Master Mix بعد از برداشتن مقدار موردنیاز از آن باید به‌سرعت به فریزر منتقل شود.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. کلیه نمونه‌ها عفونی بوده بنابراین تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP^۱ توسط کارکنان آموزش‌دیده دارای پوشش حرفه‌ای و محافظ (PPE^۲) انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-۲ انجام شود. از دستورالعمل زیر استفاده نمایید:

Interim Laboratory Biosafety Guideline for Handling and Processing Specimen Associated

۲. پیشنهاد می‌شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین‌طور بعد از کار لامپ UV زده شود.
۳. پیشنهاد می‌شود محل استخراج DNA و محل آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای اضافه کردن نمونه و نمونه استاندارد جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید.
۴. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

کنترل‌ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک DNA حاصل از استخراج نمونه‌ها استفاده شود.
۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
۳. کنترل مثبت (PTC): از استانداردهای کیت به جای نمونه در یک واکنش برای هر میکس استفاده شود.

¹ Good Laboratory Practice

² Personal Protective Equipment

نمونه‌گیری و نگهداری

۱. برای امر تشخیص و تعیین مقدار ویروس CMV، مطلوب‌ترین نوع نمونه، پلاسما با ضد انعقاد سیترات یا EDTA می‌باشد که این نوع نمونه برای این کیت به‌طور کامل مورد بررسی قرار گرفته و کاملاً مورد تأیید می‌باشد. سایر انواع نمونه (غیر از پلاسمای سیتراته یا همراه EDTA) دارای هیچ‌گونه ضمانت عملکردی نبوده و سازنده در مورد آن هیچ‌گونه مسئولیتی ندارد.
۲. نمونه خون گرفته شده باید در اسرع وقت (کمتر از شش ساعت از زمان نمونه‌گیری) پلاسما گیری شود. برای این منظور نمونه خون را به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۶۰۰-۸۰۰ سانتریفوژ کنید و پلاسمای جدا شده را به تیپ پلی پروپیلن استریل منتقل کنید. حساسیت تست در صورت منجمد کردن نمونه خون کاهش خواهد یافت به همین دلیل تا جای ممکن از این امر باید پرهیز گردد. هر چند پلاسمای جدا شده را می‌توان بدون آسیب به ژنوم ویروس برای روزها در ۴ درجه سانتی گراد، هفته‌ها در ۲۰- درجه سانتی گراد و ماه‌ها و حتی سال‌ها در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرد.
۳. نتایج منفی کاذب می‌توانند به دلیل حضور افزایش غلظت مهارکننده‌های واکنش PCR، نمونه‌گیری نامناسب، استخراج DNA غیراستاندارد، انتقال نامناسب نمونه باشد و یا از غلظت کم نمونه ناشی گردد.
۴. اگرچه هپارین یکی از پرکاربردترین مواد ضد انعقاد می‌باشد به‌هیچ‌عنوان نباید برای نمونه‌های خونی که برای آنالیز توسط این کیت مورد استفاده قرار می‌گیرد به کار رود.
۵. اگر احتمال تأخیر در استخراج نمونه‌ها وجود دارد، آن‌ها را در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد یا پایین‌تر نگهداری نمایید.
۶. نوکلئیک اسیدهای استخراج شده باید در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد یا پایین‌تر نگهداری شوند.

۷. نمونه‌هایی که ۴ روز یا بیشتر در دمای ۴-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده یا در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر فریز نشده‌اند، قابل استفاده برای آزمایش نیست.

۸. در طی انتقال نمونه به نکات ایمنی در مورد انتقال یک پاتوژن توجه کامل مبذول گردد. تا حد امکان زمان انتقال نمونه نباید از شش ساعت تجاوز کند. همچنین حمل و نقل نمونه‌های خون کامل باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و نمونه‌های پلاسما جداسازی شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد صورت گیرد.

● ایمنی زیستی در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی و زیست-پزشکی چاپ پنجم را مطالعه فرمایید.

<http://www.cdc.gov/biosafety/publications>

تاریخ انقضاء کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه آن درج شده است.

کنترل داخلی (Internal Control)

کیت حاضر، واجد کنترل داخلی اگزوزن می‌باشد. این امر به کاربر نهایی اجازه می‌دهد تا هم فرآیند تخلیص را چک کند و هم احتمال وجود مواد مهارکننده PCR را بررسی نماید. به‌طور کل در این حالت کنترل داخلی موجود در کیت را به مقدار $0.2/$ میکرو لیتر به ازاء هر ۱ میکرو لیتر از حجم الوشن بافر افزوده شده در مرحله پایانی استخراج نمونه، اضافه نمایید. برای مثال اگر ژنوم تخلیص شده را در ۵۰ میکرو لیتر آب یا الوشن بافر حل می‌کنیم باید در هنگام تخلیص پلاسما به آن پلاسما، ۱۰ میکرو لیتر کنترل داخلی اضافه نماییم. به بیان دیگر حجم کنترل اضافه شده تنها تابعی از میزان الوشن (Elution) نهایی می‌باشد. می‌توان کنترل داخلی را به مخلوط بافر لیز و پلاسما اضافه نمود. در این صورت باید اضافه کردن کنترل داخلی به مخلوط بافر لیز و پلاسما باید به صورت تازه صورت گیرد. همچنین کنترل داخلی به هیچ عنوان نباید به خود نمونه به صورت مستقیم و در غیاب بافر لیز اضافه شود. همچنین می‌توان کنترل داخلی را تنها در طی مرحله PCR اضافه کرد که در این حال

هیچ گونه کنترلی بر روی مرحله تخلیص وجود نخواهد داشت. در این حالت ۱ میکرولیترکنترل داخلی به ۱۵ میکرو لیتر MasterMix-CMV اضافه شده و سپس از این مخلوط مقدار ۱۵ میکرو لیتر با ۱۰ میکرو لیتر از نمونه تخلیص شده مخلوط می گردد.

آماده سازی

۱. در صورتی که کنترل داخلی (IC) را در مرحله استخراج و طی مراحل آماده سازی اضافه کرده اید، به ازای هر نمونه مقدار ۱۵µl از MasterMix-CMV را برای هر تست در نظر بگیرید.
۲. اگر IC را در مرحله استخراج اضافه نکردید و می خواهید در مرحله PCR به عنوان کنترل کننده مهار Realtime-PCR استفاده کنید، Master Mix را مطابق توضیح ذیل تهیه نمایید:
ابتدا ۱ میکرو لیتر از کنترل داخلی را به MasterMix-CMV مطابق جدول زیر اضافه کنید و سپس از این مخلوط ۱۵ میکرو لیتر به ازای هر واکنش استفاده نمایید (جدول ۲).

Reaction Setup	1 reaction
Master Mix - CMV	15 µl
Internal Control	1 µl
<u>Final Volume</u>	<u>16 µl</u>

جدول ۲: آماده سازی میکس با احتساب کنترل داخلی

نکته: لازم به ذکر است که در هر بار انجام تست یک لوله به عنوان (No Template Control (NTC باید گذاشته شود. بر اساس جدول فوق در NTC به جای نمونه استخراج شده آب استفاده می شود. تیوب NTC برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.

اضافه کردن الگو

پس از آماده سازی محلول ها و انتقال آن به تیوب های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۱۰ میکرو لیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسید نوکلئیک، ۱۰ میکرو لیتر از نمونه های استاندارد و ۱۰ میکرو لیتر از نمونه های بیمار را به تیوب های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه ها را نام گذاری کنید (جدول ۳).

Reaction Setup	Volume
Master Mix- CMV	15 μ l
Sample or Control	10 μ l
<u>Final Volume</u>	<u>25 μl</u>

جدول ۳: الگوی اضافه کردن نمونه

برنامه ریزی دمایی

به منظور انجام تست باید برنامه دمایی زیر برای دستگاه تعریف شود. سنجش طیف نشری (Acquisition) باید هم در کانال سبز (مربوط به سیگنال دریافتی از ژنوم CMV) و هم در کانال نارنجی (مربوط به سیگنال دریافتی از کنترل داخلی) انجام شود.

مقادیر دمایی هر قسمت در کادر زیر آورده شده است. علاوه بر تعریف دمایی، دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم گردد.

	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green (FAM) and Orange (TEXAS RED)	55°C	30 sec	
Extension	72°C	20 sec	

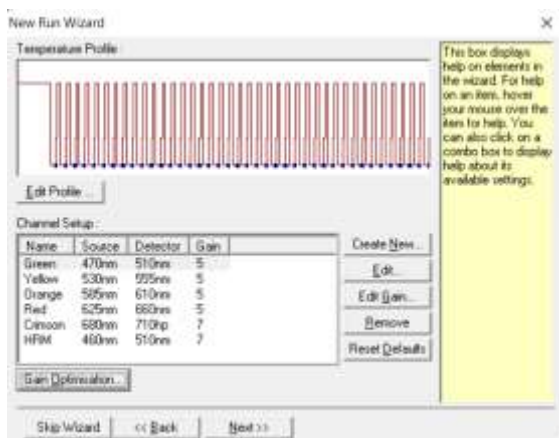
جدول ۴: برنامه‌ی دمایی

علاوه بر تعریف دمایی دستگاه که در قسمت بالا آمده است دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم گردد.

تعریف طیف سنجی فلورسنت در دستگاه‌ها

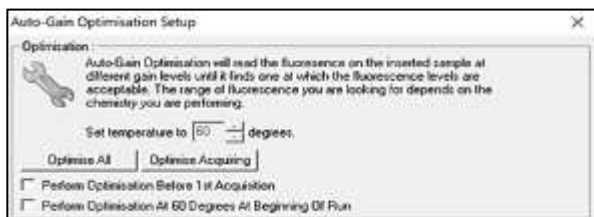
دستگاه Rotor-Gene

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱).



شکل ۱. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimize Acquiring برای هر دو کانال بازه‌ی Target نمونه range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



شکل ۲. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene

همچنین Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب اول (که حاوی مسترمیکس به همراه IC و STD1 است) انجام شود.

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisition را انتخاب کرده و پنجره را ببندید (شکل ۳).



شکل ۳. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene

تنظیم دستگاه Rotor-Gene جهت آنالیز نتایج

۱. آنالیز نتایج توسط نرم‌افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در هر کانال رنگی، آستانه را در بازه‌ی ۰/۰۲ قرار دهید.
۲. از پنجره Quantitation Analysis گزینه‌ی Slope Correct را انتخاب نمایید. توجه: دستگاه‌های دیگر دارای تنظیمات خودکار می‌باشند.

آنالیز نتایج

تعیین تعداد ژنوم ویروس CMV تخلیص شده

استانداردهای تأمین شده در این کیت معادل یک نمونه تخلیص شده با تعداد کپی ویروس کاملاً مشخص است. از آنجاکه از هر نمونه تخلیص شده مقدار ۱۰ میکرو لیتر از ژنوم تخلیص شده با ۱۵ میکرو لیتر از MasterMix مخلوط می شود باید همین روند به طور مشابه برای نمونه های استاندارد نیز اعمال گردد. برای ترسیم منحنی استاندارد هر چهار استاندارد موجود در کیت در هر بار انجام تست باید به همراه نمونه های مجهول مورد آنالیز قرار گیرد تا بتوان به واسطه منحنی استاندارد کشیده شده تعداد کپی ویروس در نمونه های مجهول تعیین گردد. برای انجام این امر باید استانداردها به عنوان استاندارد در برنامه تعریف شوند و مقدار معادل استاندارد بر اساس فرمول زیر محاسبه شده و در نرم افزار دستگاه وارد شود.

□ استانداردهای تأمین شده در کیت به صورت IU/μl می باشد. برای تبدیل این استانداردها به IU/ml از رابطه زیر استفاده کنید.

$$\text{IU/ml} = \frac{\left(\frac{\text{IU}}{\mu\text{l}} \right) \times \text{حجم الونش}}{\text{حجم نمونه تخلیص شده}}$$

نکته: در صورت استفاده ی استخراج یکسان برای تمام نمونه ها می توانید با قرار دادن مقدار استانداردها در فرمول بالا و تعریف آن در دستگاه به صورت یکجا و مستقیم ، مقدار IU/mL نمونه ارا به دست آورید.

در این صورت، مقدار نمونه های مثبت بالای مقدار LOD را به صورت دقیق مشاهده می کنید.

آنالیز اطلاعات

آنالیز اطلاعات در دستگاه Rotor-gene-۶۰۰۰ و Rotor-gene-۳۰۰۰ باید توسط نرم افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

بعد از این آنالیزها باید نتایج را به صورت زیر تفسیر کرد:

۱- سیگنال فلورسانس در کانال (A.FAM=green) کاملاً مشخص است.

نتیجه تست برای ویروس CMV مثبت است و نمونه تخلیص شده از پلاسما حاوی ویروس CMV بوده است. در این حالت، وجود سیگنال فلورسانس در کانال (Orange =Texas red) اهمیت ندارد زیرا در صورت بالا بودن غلظت اولیه ژنوم ویروس CMV سیگنال در کانال Orange می تواند بسیار ضعیف باشد یا اصلاً وجود نداشته باشد.

۲- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال (A.FAM=Green channel) مشاهده نمی شود. در همین حین سیگنال در کانال (Orange =Texas red) مربوط به کنترل داخلی قابل مشاهده است.

این حالت نشان دهنده عدم وجود ویروس CMV در نمونه پلاسما می باشد. همچنین مثبت بودن سیگنال حاصل از کانال Orange وجود هرگونه مهارکننده واکنش PCR را منتفی می کند.

۳- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال (A.FAM=Green channel) و (Orange =Texas red) قابل مشاهده نیست.

در این حالت هیچ گونه نتیجه گیری در مورد تست نمی توان انجام داد. تست باید دوباره تکرار شود.

ارزیابی آنالیتیکال و کلینیکال

حساسیت آنالیتیکی (analytical sensitivity)

محدوده تشخیص آنالیتیکال و همچنین محدوده تشخیص آنالیتیکال با در نظر گرفتن استخراج (محدودیت‌های تشخیصی) برای کیت Senmurv CMV qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت. محدوده تشخیص آنالیتیکال با استفاده از نمونه‌های بالینی مثبت برای CMV در کنار یک روش استخراج خاص تعیین می‌شود. در مقابل، محدوده تشخیص آنالیتیکال بدون استفاده از نمونه بالینی و مستقل از روش استخراج موردنظر، با استفاده از استانداردهایی با غلظت‌های معلوم تعیین می‌گردد.

برای تعیین حساسیت آنالیتیکال کیت Senmurv CMV qPCR، یک سری رقت ویروس CMV از 10^5 IU/ml تا 30 IU/ml ایجاد گردید و با استفاده از کیت Senmurv CMV qPCR و با دستگاه‌های Rotor-Gene مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در سه روز و در هشت تکرار صورت پذیرفت و نتایج از طریق آنالیز تعیین شدند. حد تشخیص آنالیتیکال کیت به همراه دستگاه Rotor-Gene 6000، به میزان 45 IU/ml برآورد شد ($p = 0.05$). این بدین معناست که پارتیکل ویروسی با رقت 45 IU/ml به احتمال ۹۵٪ قابل تشخیص هستند.

اختصاصیت (Specificity)

اختصاصیت کیت Senmurv CMV qPCR در قدم اول با انتخاب پرایمرها و پروب‌ها و همچنین انتخاب شرایط واکنش دقیق مورد تأیید قرار می‌گیرد. با استفاده از آنالیز مقایسه‌ای توالی‌ها، پرایمرها و پروب‌ها از منظر هومولوژی‌های احتمالی با تمامی توالی‌های ثبت‌شده در بانک‌های ژنی بررسی شده‌اند. قابلیت تشخیصی (Detectability) تمامی ژنو تیپ‌های مرتبط از طریق همترازسازی توالی‌ها و همین‌طور توسط واکنش PCR بر روی دستگاه‌های Rotor-Gene مورد تأیید قرار گرفت.

بعلاوه، اختصاصیت کیت از طریق ۱۰۰ نمونه مختلف پلاسمایی CMV منفی تأیید شد. این نمونه‌ها هیچ سیگنالی در کانال سبز که نشان‌دهنده حضور ویروس است، ایجاد نکردند.

واکنش‌دهی متقابل (cross-reactivity) کیت SENMURV CMV qPCR با استفاده از گروه‌های کنترل موردبررسی قرار گرفت. هیچ‌یک از پاتوژن‌های تست‌شده واکنش‌دهی (reactivity) نشان ندادند. هیچ‌گونه واکنش‌دهی متقابل در عفونت‌های مختلط ظاهر نشد (جدول ۵).

Cross-reactivity	
• Herpes simplex virus 2 (HSV-2)	• Epstein-Barr virus (EBV)
• Hepatitis A virus (HAV)	• Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
• Hepatitis B virus (HBV)	• Parvovirus B19
• Hepatitis D virus (HDV)	• Dengue virus (DENV)
• Hepatitis E virus (HEV)	• Yellow fever virus (YFV)
Hepatitis C virus (HCV)	• West Nile virus (WNV)
• Human T-lymphotropic virus II (HTLV-II)	• Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)
• Human T-lymphotropic virus I (HTLV-I)	

جدول ۵. عواملی که در اختصاصیت آنالیتیکال بررسی گشتند.

دامنه خطی (linear range)

دامنه خطی (اندازه‌گیری آنالیتیکال) کیت Senmurv CMV qPCR از طریق آنالیز سری رقت‌های استانداردهای ساخته‌شده تعیین مقدار شده با سرم کنترل‌ها در دامنه 10^2 IU/ml تا حداقل 10^5 IU/ml مشخص گردید. با فرض اینکه از کیت کیاژن برای استخراج DNA استفاده می‌شود، مشخص شد که دامنه خطی کیت Senmurv CMV qPCR از غلظت 10^2 IU/ml تا حداقل 10^5 IU/ml را پوشش می‌دهد.

دقت (Precision)

داده‌ی دقت کیت تعیین واریانس کل آزمایش را ممکن می‌سازد. واریانس کلی شامل تنوع درون-آزمایشی (تنوع در نتایج متعدد نمونه‌ها با غلظت یکسان و در یک آزمایش)، تنوع بین-آزمایشی (تنوع در نتایج متعدد حاصل آزمایش‌های مشتق از دستگاه‌های متفاوت و یا دستگاه یکسان اما توسط اپراتورهای مختلف آزمایشگاه)، و تنوع بین-بیچ (inter-batch) تنوع در نتایج متعدد حاصل از استفاده از batch‌های مختلف است. داده‌های به‌دست‌آمده برای تعیین انحراف استاندارد، واریانس و ضریب تغییرات PCRهای مختص پاتوژن و همین‌طور کنترل داخلی بکار گرفته شدند.

تکرارپذیری (Reproducibility)

داده‌های تکرارپذیری امکان ارزیابی منظم عملکرد کیت Senmurv CMV qPCR و همچنین مقایسه کارایی آن با سایر محصولات را مهیا می‌کنند. این داده‌ها را می‌توان از طریق استفاده از این کیت در دستگاه‌های با عملکرد تثبیت‌شده (آزمایشگاه‌های تأییدشده) به دست آورد.

ارزیابی تشخیصی (Diagnostic evaluation)

در قیاس با نتایج مستخرج از کیت Altona RealStar® CMV Q-PCR Kit به‌عنوان روش مرجع، حساسیت و اختصاصیت تشخیصی کیت Senmurv CMV qPCR به ترتیب ۹۸٪ و ۱۰۰٪ برای تمامی نمونه‌های سرمی به دست آمد.

پشتیبان فنی

برای پشتیبانی فنی لطفاً با تلفن‌های شرکت تماس حاصل فرمایید.

✓ ۰۹۹۳۶۶۹۳۹۴۱ (قره داغی)

✓ ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولیدشده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Conculta Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficient for <n> tets	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی: تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار 24 متری سعادت آباد، خیابان
حیدرnia (دوم شرقی)، پلاک 9، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی: 1997775555 تلفن تماس: 02122082120

پشتیبان فنی: 09936693941 (قره داغی)

Web Site: www.Senmurv.co

Email: info@senmurv.ir