



Instruction for Use

HCV Detection RT-qPCR Kit

باروش

Real-Time PCR

Model: Version 02

Cat-No: BONHCV2-24

Cat-No: BONHCV2-96



Doc. #: IFU-HCV-01 Doc. Version: 07 Revision Date: 1403-08-08

۳	شماره رفرانس
۳	شرح کیت
۳	اصول
۴	اطلاعات پاتوزن
۵	محتویات کیت
۵	نگهداری و انتقال کیت
۶	نکات احتیاط عمومی
۷	هشدارها و محدودیت‌ها
۷	کنترل‌ها
۸	نمونه‌گیری و نگهداری
۹	کنترل داخلی
۱۳	تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها
۱۵	آنالیز نتایج
۱۶	آنالیز اطلاعات
۱۷	رفع مشکل
۱۹	ارزیابی آنالیتیکال
۲۳	ارزیابی کلینیکال
۲۴	پشتیبانی فنی
۲۴	نشانه‌ها
۲۵	اطلاعات تماس

- BONHCV2-24
- BONHCV2-96

شرح کیت

کیت Senmurv HCV RT-qPCR یک سیستم آماده مصرف برای تشخیص RNA ویروس HCV از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) روی ابزارهای Rotor-Gene Q است. مستر حاوی واکنش‌گرها و آنزیم‌هایی برای تکثیر اختصاصی قطعه‌ای به طول ۹۵ bp از ژنوم HCV بوده و برای تشخیص مستقیم امپلیکون موردنظر از طریق کانال فلوروسنت Cycling Green در دستگاه‌های Rotor-Gene 3000 و Rotor-Gene 6000 طراحی گردیده است. کیت Senmurv HCV RT-qPCR همچنین حاوی سیستم ثانویه تکثیر هترولوگ برای تشخیص احتمال وجود مهارکننده واکنش PCR است. این امر از طریق شناسایی کنترل داخلی (Internal Control) در کانال فلوروسنت (Yellow = HEX) صورت می‌پذیرد.

اصول

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

اطلاعات پاتوزن

ویروس هپاتیت (HCV) عضوی از خانواده Flaviviridae است که از ۷ ژنوتیپ تشکیل شده است. این ویروس کوچک (۴۵ نانومتر) دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای به طول تقریباً ۹/۶ کیلو باز است. توزیع جغرافیایی ۶ ژنوتیپ مختلف بر اساس منطقه متفاوت است و ژنوتیپ ۱ HCV شایع‌ترین ژنوتیپ (۴۶٪) در سطح جهان است.

انتقال از طریق خون، رایج‌ترین حالت عفونت است که از طریق روش‌های تزریق غیر ایمن، استریلازیسیون ناکافی تجهیزات پزشکی در محیط‌های مراقبت‌های بهداشتی و خون و محصولات خونی غربال نشده صورت می‌گیرد.

تظاهرات بالینی در بیماری HCV به صورت بیماری حاد و مزمن بروز پیدا می‌کند. بیشتر افراد مبتلا به بیماری حاد علامت‌دار هستند و از عفونت خود اطلاع ندارند. خطر ابتلا به بیماری مزمن پس از عفونت حاد بسیار زیاد است (۵۵٪ - ۸۵٪). عفونت‌های HCV یکی از دلایل اصلی بیماری مزمن کبدی در سراسر جهان است. عفونت مزمن HCV معمولاً به آرامی پیشرفت می‌کند و اکثر بیماران بدون علامت هستند یا فقط علائم خفیف غیراختصاصی دارند (به عنوان مثال خستگی، درد عضلانی، از دست دادن اشتها و حالت تهوع). تقریباً یک سوم افراد مبتلا به عفونت مزمن در طی یک دوره ۲۰ تا ۳۰ ساله به سیروز کبدی یا کارسینوم هپاتوسلولار مبتلا می‌شوند. علائم مرتبط با سیروز عبارت‌اند از: هپاتومگالی یا اسپلنومگالی در معاینه فیزیکی، افزایش غلظت بیلی روبین سرم و یا هیپرآلبومینمی.

در درمان HCV هدف اصلی بهبود عفونت، کاهش بار ویروس و درمان عفونت قبل از منجر شدن به عوارض شدید است. در طول دوره درمان که عمدتاً با قرص‌های ضدویروسی با اثر مستقیم انجام می‌شود، آزمایش خونی به منظور بررسی اثربخشی داروهای تجویز شده انجام می‌شود و اگر لازم باشد نوع دارو و یا دوز آن‌ها جهت رسیدن به نتیجه مطلوب تغییر خواهد کرد. در پایان دوره درمانی آزمایش دیگری انجام می‌شود که مشخص گردد آیا ویروس به طور کامل از بدن حذف شده است یا نه. بنابراین، اثربخشی مکانیسم درمانی با اندازه‌گیری سطح HCV RNA در بازه‌های زمانی خاص، با استفاده از یک روش حساس مولکولی بررسی می‌شود.

Title	24 Tests	96 Tests
	Volume per Vial	Volume per Vial
HCVMaster-A	330 µl/tube	330 µl/tube × 4
HCVMaster-B	30 µl/tube	120 µl/tube
Std1 : 5×10^4 IU/µl	100 µl/tube	100 µl/tube
Std2 : 5×10^3 IU/µl	100 µl/tube	100 µl/tube
Std3 : 5×10^2 IU/µl	100 µl/tube	100 µl/tube
Std4 : 5×10^1 IU/µl	100 µl/tube	100 µl/tube
Internal control	300 µl/tube	1200 µl/tube
Nuclease-Free Water	250 µl/tube	250 µl/tube

جدول ۱. محتویات کیت

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی گراد هیچ گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل بر روی بسته های یخ زده (یخ زده Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان طور که روی برچسب بسته بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و در نتیجه عدم کارایی کیت می شود. بیش از دو بار منجمد و ذوب کردن کیت به هیچ وجه توصیه نمی گردد.
- ✓ از قرار دادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله ها را به طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده اند.

مواد و تجهیزاتی که باید توسط کاربر تهیه شوند :

۱. کیت استخراج RNA
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه هاش مختلف و نوک سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزی
۴. بلوک خنک کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. لوله های ۰/۲ و ۰/۱ میکرولیتر
۸. دستگاه Rotor-Gene با کانال های فلورسنت مخصوص Cycling و Cycling Green و Yellow و یا Cycling A.FAM (JOE) و Cycling A.HEX
۹. نرم افزار Rotor-Gene Q (نسخه ۱/۷/۹۴) نرم افزار Rotor-Gene ۶۰۰۰ (نسخه ۱/۷/۹۴) و نرم افزار Rotor-Gene ۳۰۰۰ (نسخه ۱/۷/۸۷، ۱/۷/۹۴) و نرم افزار Rotor-Gene ۳۰۰۰ (نسخه ۶/۰/۲۳ یا بالاتر)
۱۰. استریپ و کپ 0.1 ml برای استفاده در روتور ۷۲ چاهکی (شماره کاتالوگ ۹۸۱۱۰۳ و یا ۹۸۱۱۰۶)
۱۱. در غیر این صورت: لوله های 0.2 ml PCR برای روتورهای ۳۶ چاهکی (شماره کاتالوگ ۹۸۱۰۰۵ و یا ۹۸۱۰۰۸)

نکات احتیاط عمومی

۱. نگهداری و تخلیص نمونه های مثبت برای HCV، نمونه های گرفته شده از مریض، کنترل ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده سازی Master Mix صورت پذیرد.
۲. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.
۳. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد (به ویژه استانداردهای کیت) را به خوبی پیتاژ نمایید و به طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طور کامل توصیه می شود.

۴. 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 به سرعت به فریزر منتقل شود.
۵. از سر سمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده نمایید.
۶. هنگام کار با مواد شیمیایی، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یک بار مصرف، و عینک‌های محافظ داشته باشید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. کلیه نمونه‌ها عفونی بوده بنابراین تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP^۱ توسط کارکنان آموزش دیده دارای پوشش حرفه‌ای و محافظ^۲ (PPE) انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-۲ انجام شود.
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 RNA، آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای آماده کردن 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 RNA حاصل از استخراج نمونه استفاده شود.
۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
۳. استاندارد (STD): از استاندارد کیت بجای نمونه در یک واکنش استفاده گردد.

^۱ Good Laboratory Practice

^۲ Personal Protective Equipment

نمونه‌گیری و نگهداری

۱. برای امر تشخیص و تعیین مقدار ویروس هپاتیت C می‌توان نمونه‌های متفاوتی از جمله پلاسما، سرم، مایع مغزی نخاعی و غیره را مورد استفاده قرار داد، اما معمول‌ترین نمونه مورد استفاده نمونه پلاسما می‌باشد.
 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 پلاسما جداسازی 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 پلاسما جداسازی 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 RNA غیر استاندارد، انتقال نامناسب نمونه باشد و یا از غلظت کم نمونه ناشی گردد.
 ۴. اگرچه هپارین یکی از پرکاربردترین مواد ضد انعقاد می‌باشد به هیچ عنوان 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 سانتی گراد نگهداری شده یا در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد یا پایین‌تر فریز نشده‌اند، قابل استفاده برای آزمایش نمی‌باشد.
- ایمنی زیستی در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی و زیست-پزشکی چاپ پنجم را مطالعه فرمایید.

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

کنترل داخلی

کیت حاضر، واجد کنترل داخلی اگزوزن می باشد. این امر به کاربر نهایی اجازه می دهد تا هم فرآیند تخلیص را چک کند و هم احتمال وجود مواد مهارکننده PCR را بررسی نماید. به طور کل در این حالت کنترل داخلی موجود در کیت را به مقدار 0.2 میکرو لیتر به ازاء هر 1 میکرو لیتر از حجم الوشن بافر افزوده شده در مرحله پایانی استخراج نمونه، اضافه نمایید. برای مثال اگر ژنوم تخلیص شده را در 50 میکرو لیتر آب یا الوشن بافر حل می کنیم باید در هنگام تخلیص پلاسما ی مربوط به آن به پلاسما، 10 میکرو لیتر کنترل داخلی اضافه نماییم. به بیان دیگر حجم کنترل اضافه شده تنها تابعی از میزان الوشن (Elution) نهایی می باشد. این کنترل داخلی را می توان به مخلوط بافر لیز و پلاسما اضافه نمود. این نکته قابل ذکر است که 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 می توان 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 1 میکرو لیتر کنترل داخلی به 15 میکرو لیتر مخلوط MasterMix های A و B اضافه شده و سپس از این مخلوط مقدار 15 میکرو لیتر با 10 میکرو لیتر از نمونه تخلیص شده مخلوط می گردد.

آماده سازی

آماده سازی با دو روش صورت می گیرد :

۱. در صورتی که کنترل داخلی (IC) را در مرحله استخراج و طی مراحل آماده سازی اضافه کرده اید، به ازای هر نمونه مقدار 15 μ l از مخلوط MasterMix های A و B را برای هر تست در نظر بگیرید (جدول ۲).

Title	Volume
HCVMaster-A	13.75 μ l
HCVMaster-B	1.25 μ l
Total	15 μ l

جدول ۲. روش اول آماده سازی بدون افزودن IC در حین Real-time

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 تهیه نمایید:
ابتدا ۱ میکرو لیتر از کنترل داخلی را به مخلوط MasterMix های A و B مطابق جدول زیر اضافه کنید و سپس از این مخلوط ۱۵ میکرو لیتر به ازای هر واکنش استفاده نمایید (جدول ۳).

Title	Volume
HCVMaster-A	13.75 μ l
HCVMaster-B	1.25 μ l
Internal Control	1 μ l
Total	16 μ l

جدول ۳. 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 ۴).

Reaction Setup	Volume
Total MasterMix	15 μ l
Sample or Standard or NTC	10 μ l
Final Volume	25 μ l

جدول ۴. 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 HCV) 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.

Steps	Temperature	Hold	Cycle
Reverse Transcription	50 °C	20 min	1
Pre-Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green (FAM) and Yellow (HEX)	55°C	45 sec	
Extension	72°C	15 sec	

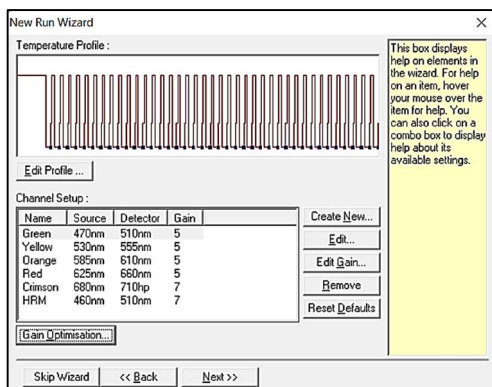
جدول ۴. برنامه ی دمایی

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

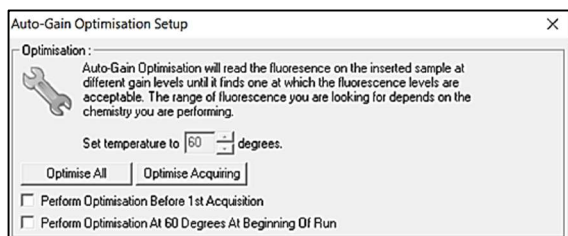
دستگاه Rotor-Gene

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



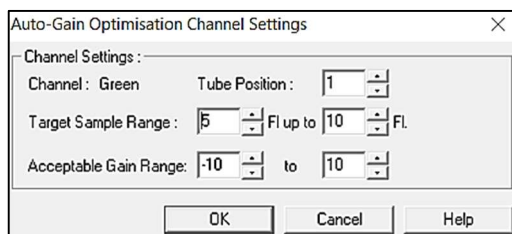
شکل ۱. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Gain Optimization

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



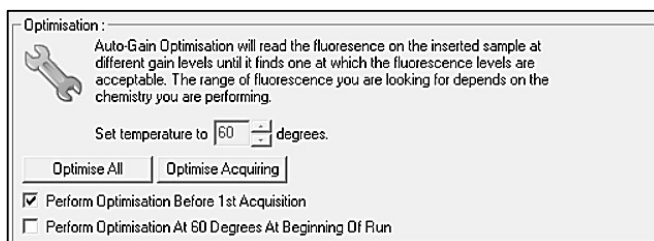
شکل ۲. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

همچنین Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب اول (که حاوی مسترمیکس A و B به همراه IC و STD1 است) انجام شود (شکل ۳).



شکل ۳. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی **Perform Optimization Before 1st Acquisition** را انتخاب کرده و پنجره را ببندید (شکل ۴).



شکل ۴. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

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 HCV تخلیص شده

استانداردهای تأمین شده در این کیت معادل یک نمونه تخلیص شده با تعداد کپی ویروسی کاملاً مشخص است. از آنجاکه از هر نمونه تخلیص شده مقدار ۱۰ میکرو لیتر از ژنوم تخلیص شده با ۱۵ میکرو لیتر از میکس MasterMixها 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.

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

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 ها را به دست آورید.

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

آنالیز اطلاعات

حد آستانه (Threshold) را بر روی Baseline و در $Th = 0.02$ قرار دهید. سپس نتایج را به صورت زیر تفسیر کنید:

- ۱- سیگنال فلورسانس در کانال (A.FAM=green) کاملاً مشخص است.
نتیجه تست برای ویروس مثبت است و نمونه تخلیص شده از پلاسما حاوی ویروس HCV بوده است.
در این حالت، وجود سیگنال فلورسانس در کانال (Yellow= HEX) اهمیت ندارد زیرا در صورت بالا بودن غلظت اولیه ژنوم ویروس سیگنال در کانال Yellow 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 (Yellow= HEX) مربوط به کنترل داخلی قابل مشاهده است.
این حالت نشان دهنده عدم وجود ویروس در نمونه پلاسما می باشد. همچنین مثبت بودن سیگنال حاصل از کانال Yellow= HEX وجود هرگونه مهارکننده واکنش PCR را منتفی می کند.
- ۳- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال A.FAM و کانال Yellow:HEX قابل مشاهده نیست.
در این حالت هیچ گونه نتیجه گیری در مورد تست نمی توان انجام داد و تست باید دوباره تکرار شود.

نتایج	تفسیر
HCV RNA >75 IU/ml	نتیجه در محدوده آزمایش تعیین شده است. احتمال تشخیص HCV RNA بیش از ۹۵٪ است. نتیجه آزمایش مثبت از نظر آماری تضمین شده است.
HCV RNA <75 IU/ml	نتیجه خارج از محدوده تست تعیین شده است. تکرارپذیری نتیجه مثبت تضمین نمی شود.
HCV RNA negative	هیچ HCV RNA شناسایی نشد.

جدول ۵. تفسیر نتایج

مشکل	دلیل بروز مشکل	اقدام اصلاحی
1 هیچ سیگنالی دریافت نشده ولی کنترل مثبت سیگنال دارد.	استخراج RNA	استخراج RNA با برخی از کیت‌ها ممکن است همراه با برخی ناخالصی‌هایی باشد که با مسترمیکس واکنش مهاری دهد
2 هیچ سیگنالی از هیچ کانالی دریافت نمی‌شود (حتی در نمونه استاندارد و کنترل داخلی کیت نیز هیچ سیگنالی رؤیت نشده)	مشکل از مستر میکس می‌باشد	واکنش را مجدد روی کنترل مثبت کیت تکرار کنید تا از مشکل مسترمیکس اطمینان حاصل کنید.
	مشکل از دستگاه یا نرم‌افزار آن می‌باشد	از نحوه run دستگاه و همچنین سلامت دستگاه اطمینان حاصل کنید.
3 رؤیت سیگنال در نمونه کنترل منفی	آلودگی فضای هود یا work station که میکس اولیه آماده می‌گردد.	با سفیدکننده ۱۰٪ تمام سطوح هود را تمیز کنید و به مدت ۲۰ دقیقه سفیدکننده ۱۰٪ بگذارید روی سطوح بماند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه UV را روشن کنید.
	مشکل از سمپلر آلوده یا مشترک می‌باشد	امکان دارد طی روند کار به هر علتی سمپلر هود تمیز شما مقداری آلودگی داشته باشد برای رفع آلودگی بیرون و داخل سمپلر را با وایتکس ۱۰٪ خوب تمیز کنید و سمپلرها را زیر UV به طریقی که سر آن‌ها UV بخورد قرار دهید/ هرگز از سمپلر مشترک که برای نمونه بیمار یا کنترل مثبت استفاده

³ Troubleshooting

			می کنید جهت درست کردن میکس اولیه استفاده نکنید.
	استفاده از یک فضا جهت RT-qPCR		توجه داشته باشید که برای انجام تست باید دو فضای مجزا (هود مجزا) برای میکس اولیه و اضافه کردن نمونه بیمار داشته باشید.
4	شدت فلورسنت کم است	مستر میکس نهایی بیش از ۲ بار فریز و دفریز شوند.	برای جلوگیری از این اتفاق دفعه اول به اندازه مورد نیاز هر بار استفاده مستر میکس ها را الکوت کنید در غیر این صورت اگر طی دو یا سه روز کل کیت مصرف می شود مستر میکس ها را در دمای ۴ درجه نگهداری کنید.
5	سیگنال فلورسنت حالت سیگموئیدی ضعیفی دارد	کیفیت RNA استخراج شده مناسب نیست.	در صورت امکان دوباره فرآیند استخراج RNA و یا نمونه گیری را تکرار کنید.
6	گرفتن سیگنال های خطی (noise)	نرم افزار دستگاه	برای دستگاه Qiaqen (کوربت) گزینه outlier removal را طبق شرایط بهینه نمونه روی ۵٪ بگذارید.

جدول ۶. رفع مشکل

ارزیابی آنالیتیکال

اختصاصیت آنالیتیکال

اختصاصیت کیت در قدم اول با انتخاب پرایمرها و پروب ها و همچنین انتخاب شرایط واکنش دقیق مورد تأیید قرار می گیرد. با استفاده از آنالیز مقایسه ای توالی ها، پرایمرها و پروب ها از منظر هومولوژی های احتمالی با تمامی توالی های ثبت شده در بانک های ژنی بررسی شده اند. قابلیت تشخیصی (Detectability) تمامی ژنوتیپ های مرتبط از طریق همترازسازی توالی ها و همین طور توسط واکنش PCR بر روی دستگاه های Rotor-Gene مورد تأیید قرار گرفت.

بعلاوه، اختصاصیت کیت از طریق ۱۰۰ نمونه مختلف پلاسمایی HCV منفی تأیید شد. این نمونه ها هیچ سیگنالی در کانال سبز که نشان دهنده حضور ویروس است، ایجاد نکردند.

واکنش دهی متقابل (cross-reactivity) با استفاده از گروه های کنترل مورد بررسی قرار گرفت. هیچ یک از پاتوژن های تست شده واکنش دهی (reactivity) با کیت حاضر نشان ندادند و هیچ گونه واکنش دهی متقابل در عفونت های مختلط ظاهر نشد (جدول ۷).

CONTROL GROUP	HCV	Internal Control
Herpes simplex virus 1	-	+
Herpes simplex virus 2	-	+
Epstein-Barr virus	-	+
Cytomegalovirus	-	+
Hepatitis A virus	-	+
Hepatitis B virus	-	+
Hepatitis D virus	-	+
Hepatitis E virus	-	+
Varicella-zoster virus	-	+
Escherichia coli	-	+
HIV1&2	-	+
Human T cell leukemia virus type	-	+
parvovirus B19	-	+

جدول ۷. عواملی که در اختصاصیت آنالیتیکال بررسی گشتند.

محدوده تشخیص آنالیتیکال و همچنین محدوده تشخیص آنالیتیکال با در نظر گرفتن استخراج (محدودیت‌های تشخیصی) برای کیت مورد ارزیابی قرار گرفت. محدوده تشخیص آنالیتیکال با استفاده از نمونه‌های بالینی مثبت برای HCV 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، یک سری رقت ویروس HCV از ۵۰ IU/ml تا ۱۰ IU/ml ایجاد گردید و با استفاده از کیت Senmurv HCV 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. از آنجاکه آخرین رقتی که به صورت ۱۰۰٪ خوانش گردید بین ۵۰۰ - ۵۰ IU/ml بود، رقت‌های پایین آن را به صورت ۱۲۵، ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۶۰، تهیه گردید و در ۲۰ تکرار رقت‌ها بررسی شدند. رقت ۷۵ IU/mL به صورت ۱۰۰٪ مثبت تشخیص داده شد ولی رقت ۶۰ IU/mL تنها در ۶۶٪ موارد شناسایی گردید. بنابراین LOD کیت بین ۶۰-۷۵ IU/mL به دست آمد. این بدین معناست که پارتیکل ویروسی با رقت بین ۶۰-۷۵ IU/mL به احتمال ۹۵٪ قابل تشخیص هستند.

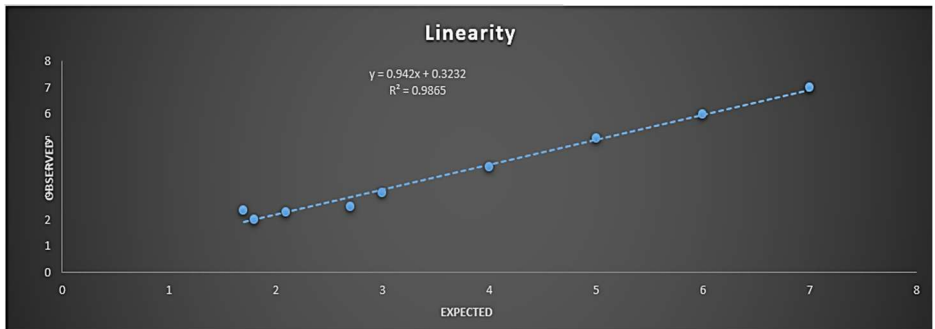
تبادل و هم‌ارزی بین دو دستگاه Rotor-Gene 3000 و Rotor-Gene 6000 بر اساس مشخصات فنی تأییدشده با مقایسه عملکرد آنالیتیکال نشان داده شده است. آنالیزهای هر دو دستگاه به طور موازی صورت گرفت. محدوده تشخیص آنالیتیکال در دستگاه Rotor-Gene 6000 در بازه اطمینان دستگاه Rotor-Gene 3000 قرار می‌گیرد. بنابراین، کیت تولیدشده می‌تواند برای تشخیص RNA ویروس HCV در دستگاه Rotor-Gene 6000 با حساسیت برابر مورد استفاده قرار بگیرد.

خطی بودن (Linearity)

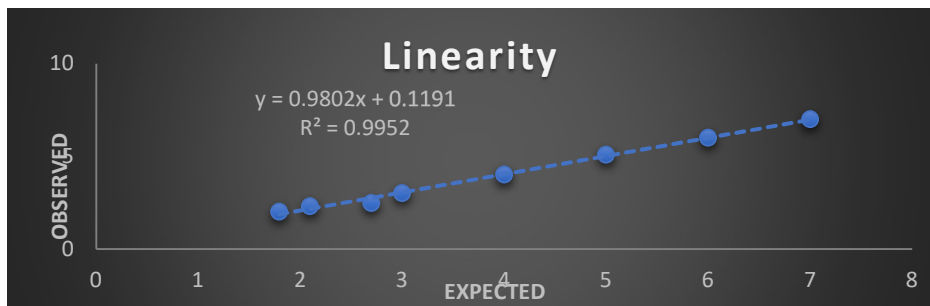
هدف تخمین بازه غلظتی است که در این بازه داده‌های حاصل از سنجش کمی ویروس دارای رفتار خطی بر روی منحنی آنالیز باشد. مطابق EP6-A، برای استانداردها در طول ۵ روز به صورت دابلیکیت، ریل تایم گذاشته شد. سپس خطی بودن استانداردها بررسی گردید.

Linearity		
IU/ml	Expected (Log)	Observed (Log)
50	1.69	2.35
62.5	1.79	2.01
125	2.09	2.3
500	2.69	2.48
1000	3	3.02
10000	4	4.01
100000	5	5.08
1000000	6	5.99
10000000	7	7

جدول ۸. خطی بودن داده‌ها



شکل ۵. نتایج خطی بودن کیت در بازه ۵۰ IU/ml تا ۱۰^۷ IU/ml



شکل ۶. نتایج خطی بودن کیت در بازه ۱۰۰ IU/ml تا ۱۰^۷ IU/ml

بر اساس مقایسه دو گراف فوق این مطلب قابل دستیابی است که linearity تست در ۱۰۰ IU/ml تا ۱۰^۷ IU/ml با $R^2 = 0.9952$ و شیب خط برابر با ۰/۹۸ قابل قبول است.

ارزیابی کلینیکال

تعداد ۱۰۲ نمونه بیمار منفی و ۱۰۳ نمونه بیمار مثبت با کیت بررسی شدند. با توجه به نتایج به دست آمده از ۱۰۲ نمونه منفی ۱۰۲ مورد منفی شناسایی شدند و از بین ۱۰۳ نمونه مثبت ۱۰۱ نمونه به درستی تشخیص داده شد، که بر اساس فرمول حساسیت و اختصاصیت نتایج زیر به دست آمد (جدول ۹).

		SENMURV HCV qRT-QPCR kit		
		+	-	Total
Altona HCV RT-qPCR kit 2.0	+	101	2	103
	-	0	102	102

جدول ۸. بررسی حساسیت و اختصاصیت کیت

در قیاس با نتایج مستخرج از کیت Altona HCV RT-qPCR kit 2.0 به عنوان روش مرجع، حساسیت تشخیصی و اختصاصیت تشخیصی کیت SENMURV HCV qPCR به ترتیب ۹۸٪ و ۱۰۰٪ برای تمامی نمونه‌ها به دست آمد.

پشتیبانی فنی

جهت ارتباط با پشتیبانی فنی با شماره‌های زیر تماس حاصل فرمایید .

✓ ۰۹۹۰۳۶۶۹۳۹۴۱ (آقای قره داغی)

✓ ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

نشانه ها

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

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد، خیابان
حیدر نیا (دوم شرقی)، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی: ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ تلفن تماس: ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Web Site : www.Senmurv.co

Email : info@senmurv.ir