



دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

ویروس HSV-1 و HSV-2

با روش Real-Time PCR



Doc. #: IFU-HSV 1/2 Doc. Version: 02 Revision Date: 09-12-2022

۳	شماره فرانس
۳	شرح کیت
۳	اصول
۳	اطلاعات پاتوزن
۴	محتویات کیت
۴	نگهداری و انتقال کیت
۵	نکات احتیاط عمومی
۷	هشدارها و محدودیت‌ها
۷	نمونه‌گیری و نگهداری
۸	عوامل تداخلی
۹	آماده سازی
۱۰	اضافه کردن الگو
۱۰	برنامه ریزی دمایی
۱۱	تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌های مختلف
۱۳	آنالیز نتایج
۱۴	نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف
۱۷	نشانه ها
۱۷	اطلاعات تماس

- BONHSV1/2-24
- BONHSV1/2-48

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) به صورت Real-Time ساخته شده است. این محصول برای تشخیص در شرایط آزمایشگاهی و برای تشخیص ویروس HSV1 و HSV2 تهیه شده است. نتایج تشخیصی به دست آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم ویروس می باشد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق فلوروسنت شناسایی می شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می سازد. این کیت در قالب یک پلتفرم مولتی پلکس شامل سه ست پرایمر و پروب طراحی شده است که قادر به تشخیص همزمان افتراقی دو ویروس HSV1 و HSV2 به ترتیب با فلوروفورهای FAM و TEXAS RED می باشد. در این کیت از یک اندوژن انسانی به عنوان کنترل داخلی با فلوروفور HEX به منظور کنترل دقت در پروسه استخراج و سمپلینگ استفاده شده است همچنین وجود کنترل داخلی، از گزارش منفی کاذب حاصل از مهار PCR پیشگیری میکند.

اطلاعات پاتوژن

ویروس های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ (HSV-1 و HSV-2) از مهم ترین ویروس های بیماری زای انسانی و دو عضو بسیار مهم از خانواده ی Herpesviridae هستند و همراه با ویروس Varicella-zoster (VZV)، تحت عنوان alphaherpesviridae طبقه بندی می شوند. HSV-1 و HSV-2 دارای ژنوم DNA دو رشته ای خطی و به طول تقریبی ۱۵۰ kbp هستند که با یک کپسید پروتئینی با تقارن ۲۰ وجهی احاطه شده اند و در بیش از ۸۰٪ ناحیه ی کدکننده ی پروتئین ژنوم خود با یکدیگر اشتراک دارند.

عفونت‌های HSV در سرتاسر جهان بدون توزیع فصلی رخ می دهند. اگرچه عفونت HSV معمولاً بدون علامت است، اما می تواند طیف گسترده ای از علائم بالینی، از جمله تبخال دهان، تبخال تناسلی، تبخال نوزادی، آنسفالیت و تبخال چشمی را ایجاد کند.

این ویروس‌ها بسیار شایع و مسری هستند و از طریق تماس مستقیم با ترشحات حاوی ویروس مانند بزاق و ترشحات دستگاه تناسلی منتقل می شوند. شیوع عفونت HSV-2 به تدریج از دوران کودکی افزایش می یابد و در سال های بعد به ۸۰ درصد و بیشتر می رسد، در حالی که تا نوجوانی، نمونه های خونی کمی از مبتلایان، HSV⁺ می شوند.

اکثر عفونت های اولیه ی HSV-1 به صورت عفونت های خفته یا ناشناخته بروز پیدا می کنند. عفونت های اولیه با HSV-2 به طور معمول به صورت تبخال تناسلی ظاهر می شوند. عفونت اولیه با HSV-1 یا HSV-2، تاخیر در ایجاد گانگلیون ریشه پشتی را به دنبال دارد. به طور دوره ای، ویروس دوباره فعال می شود و از طریق آکسون عصبی به محل های دهان یا تناسلی می رود، در نتیجه ویروس عفونی آزاد شده و در برخی موارد، ضایعه ایجاد می شود.

محتویات کیت

Title	96 Tests	48 Tests	24 Tests
	Volume per Vial	Volume per Vial	Volume per Vial
MasterMix HSV-1/2	720 µl/tube × 2	360 µl/tube × 2	360 µl/tube × 1
Positive Control	50 µl/tube × 2	50 µl/tube × 1	50 µl/tube × 1

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 (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.
- ✓ از قراردادن 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 به طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.

مواد و تجهیزات مورد نیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود:

۱. کیت استخراج DNA
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوک سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفیوژ رومیزی
۴. بلوک خنک‌کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. دستگاه با قابلیت خوانش در کانال Green, Yellow, Orange
۸. نرم‌افزار 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. استفاده از سرمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free

۳. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای نمونه‌های گرفته شده از بیمار، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده‌سازی MasterMix صورت پذیرد.
۴. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.
۵. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به خوبی پیپتاژ 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 MasterMix باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به Master Mix بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.
۷. هنگام کار با مواد شیمیایی، روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یکبار مصرف، و عینک‌های محافظ داشته باشید.
۸. کیت حاوی کنترل مثبت است. برای جلوگیری از آلودگی که ممکن است باعث ایجاد مثبت کاذب شود، کنترل مثبت را از سایر مواد موجود در کیت کاملاً جدا کنید.
۹. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرایند کار را با دقت انجام دهید.
۱۰. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
۱۱. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتردار برای جلوگیری از ورود آلودگی DNA استفاده کنید.
۱۲. لطفاً لوله‌های PCR را پس از امپلیفای باز نکنید.
۱۳. از استفاده ی مجدد مواد یکبار مصرف پرهیزید.
۱۴. مواد موجود در کیت که بلا استفاده شدند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱۵. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ تمیز کنید.

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP^۱ توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)^۲ انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود. (استفاده از دستورالعمل: 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، آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای آماده‌سازی و اضافه کردن نمونه و نمونه کنترل مثبت 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 حاصل از استخراج DNA استفاده شود.
۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
۳. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نمونه‌گیری و نگهداری

نمونه مورد نیاز می‌تواند یکی از موارد ذیل باشد:

سرم یا پلاسما، ادرار، مایعات بدن نظیر مایع مغزی-نخاعی (CSF)، آمنیوتی و چشمی، نمونه‌های تناسلی نظیر نمونه تهیه شده از سرویکس، واژن و یا سایر بخش‌های تناسلی، نمونه‌های تنفسی نظیر ترشحات برونش، نازوفارنکس و نایی، BAL و بزاق، بافت‌های مختلف نظیر مغز، کولون، کلیه، کبد، ریه و غیره و یا سایر نقاط بدن که درگیر عفونت ویروسی شده اند، نظیر پوست، بینی، گلو و غیره.

^۱ Good Laboratory Practice

^۲ Personal Protective Equipment

نمونه‌گیری باید در شرایط استریل صورت گیرد.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

۱. از ظرف های مخصوص و یکبار مصرف برای جمع آوری نمونه استفاده کنید.
۲. برای جمع‌آوری خون یا پلاسما، از لوله‌های استریل حاوی مواد ضدانعقادی مانند EDTA یا سیترات استفاده کنید. توجه داشته باشید که نمونه‌های حاوی هپارین به دلیل اثر مهارى این ماده برای PCR مناسب نیستند.
۳. طی چند ساعت اولیه پس از خون‌گیری، سرم یا پلاسما را جدا و تا زمان انجام آزمایش در دمای 20°C - نگهداری کنید. سایر نمونه‌های مورد استفاده را نیز طی چند ساعت اولیه پس از نمونه‌گیری در دمای 20°C - نگهداری و از فریز و ذوب کردن مکرر آن‌ها خودداری نمایید.
۴. در صورت حمل و نقل نمونه، نمونه را در شرایط سرد و همراه یخ منتقل کنید.
۵. در صورت نبود شرایط برای انتقال نمونه در ۲۴ ساعت اولیه، نمونه را در 20°C - فریز نمایید.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

کنترل داخلی (Internal Control)

وجود کنترل داخلی در کیت به کاربر این امکان را می‌دهد که فرآیند تخلیص و احتمال وجود مواد مهارکننده PCR را بررسی نماید.

عوامل تداخلی

EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس ($1\mu\text{l}$)، خون ($1\mu\text{l}$)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر) و بافر لیز عملکرد آزمایش را مهار می‌کنند. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل ردیابی است.

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسید نوکلئیک باید توسط کیت‌های جداسازی موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود. کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

آماده‌سازی

۱. ابتدا لوله‌ها را روی ریک‌بیخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و لوله‌های MasterMix و کنترل مثبت را به آرامی ورتکس کنید و به‌طور مختصر سانتریفیوژ کنید.

۲. مقدار ۱۵ میکرولیتر MasterMix را به لوله‌های PCR اضافه کنید.

۳. مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسید نوکلئیک جدا شده یا ۱۰ میکرولیتر کنترل مثبت را به لوله‌های PCR جداگانه اضافه کنید. در حین تهیه PCR لازم است همه اجزا در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. از مواد بالینی منفی می‌توان به‌عنوان کنترل جداسازی منفی استفاده کرد.

۴. لوله‌ها را ببندید، مختصراً سانتریفیوژ کنید، آن‌ها را داخل دستگاه قرار دهید و اجازه دهید مطابق مشخصات برنامه قید شده در این دفترچه تکثیر شوند. هنگام استفاده از کنترل مثبت یا مواد بالینی بسیار مراقب باشید.

۵. در این مرحله، بهتر است از فضاهای جداگانه برای اضافه کردن مستر واکنش و نمونه‌های بیمار استفاده کرد و همچنین در نظر داشته باشید که در ویال کنترل مثبت را تنها در محل آماده‌سازی مستر واکنش و فضای تمیز باز کنید.

نکته در هر بار انجام تست یک لوله به‌عنوان No Template Control (NTC) باید گذاشته شود. در NTC به‌جای نمونه استخراج شده از آب استفاده می‌شود که 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، ۵ میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسیدنوکلیک، ۵ میکرولیتر از کنترل مثبت و ۵ میکرولیتر 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.

Reaction Setup	Volume
Master Mix	15 μ l
Sample or Control	5 μ l
Final Volume	20 μ l

برنامه ریزی دمایی

دستورالعمل برای دستگاه های ABI StepOne و Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه های Real-Time PCR دارای کانال Green, Yellow, Orange نیز برای استفاده از این-کیت مناسب هستند. پس از تنظیم کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. در-صورت استفاده از دستگاه ABI StepOne گزینه رنگ رفرنس داخلی (Passive Refrence) را حذف کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه Rotor Gene به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول زیر آورده شده است.

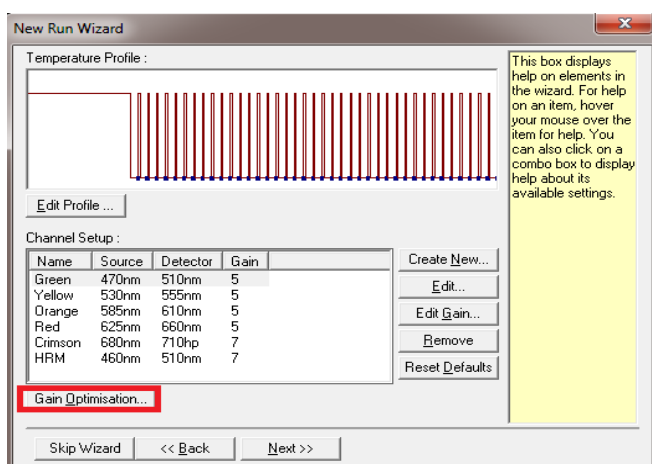
	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	4 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green, Yellow, Orange	60 °C	45 sec	

علاوه بر تعریف دمایی دستگاه که در قسمت بالا آمده است دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم گردد. اندازه گیری تابش فلورسانس باید برای رنگ Green, Yellow, Orange تنظیم شود.

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه های مختلف:

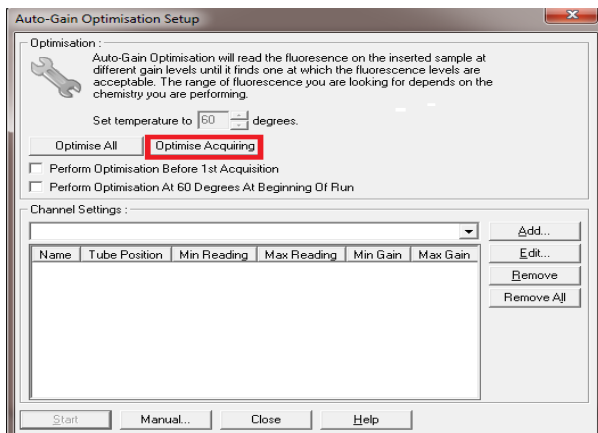
دستگاه Rotor-Gene:

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

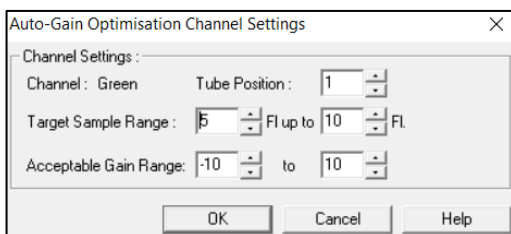


شکل ۱. تنظیمات دستگاه

در این صفحه با انتخاب گزینه ی Optimise Acquiring برای کانال Green, Yellow, Orange بازه Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲). همچنین Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب عدد نوشته شده در کادر Tube Position صحیح انتخاب شده باشد (شکل ۳).

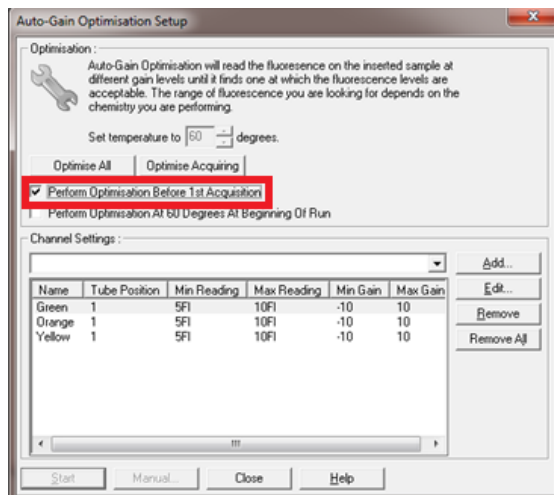


شکل ۲. تنظیمات دستگاه



شکل ۳. تنظیمات دستگاه

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



شکل ۴. تنظیمات دستگاه

آنالیز نتایج

۱. آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در 3 کانال رنگی Green(FAM) ، Yellow (HEX) و Orange (Texas Red) پس از قرار آستانه (Threshold) را در بازه‌ی مناسب قرار دهید.

۲. برای تفسیر نتایج، مطابق جدول زیر عمل کنید. خوانش هر یک از میکس‌های ۱ و ۲ در هر یک از کانال‌های فلورسانس مشخص می‌کند کدام تایپ HSV در نمونه وجود دارد.

	Green(FAM)	Orange(TEX)	Yellow(IC)
HSV-1 Detected	+	-	+
HSV-2 Detected	-	+	+
HSV NOT Detected	-	-	+
Invalid	-	-	-

بعد از آنالیز باید نتایج را به صورت زیر تفسیر کرد:

۱. نمونه زمانی مثبت می شود که دارای دو شرط زیر باشد.

A. دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد.

B. HSV-1 Ct و HSV-2 کمتر از ۴۰ باشد.

با توجه به موارد بالا، نتیجه منفی یک نمونه، مستلزم داشتن IC با $CT \leq 30$ در کانال نارنجی و جواب منفی برای بقیه کانال ها است.

۲. در آنالیز HSV، در صورت مشاهدهی اختلاف سیکل کمتر از ۳ سیکل بین دو نوع

HSV-1 و HSV-2، نمونه دارای هر دو واریانت HSV-1 و HSV-2 می باشد. در

اختلاف بیشتر از ۳ سیکل، ویروس با سیکل آستانه ای کمتر مثبت می باشد.

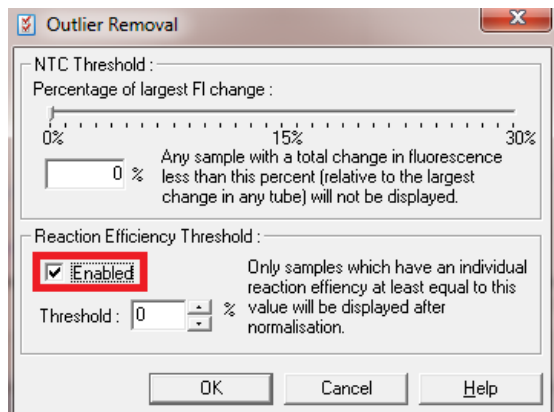
نکات آنالیز نتایج در دستگاه های مختلف

دستگاه Rotor-Gene:

آنالیز اطلاعات در دستگاه Rotor-gene 6000 و Rotor-gene 3000 باید توسط نرم افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

۱. از منوی Analysis, Quantitation را انتخاب کرده و روی یک رنگ، به طور مثال Green، دوبار کلیک کنید .

۲. با کلیک بر گزینه ی Outlier Removal, Reaction Efficiency Threshold را فعال کنید (شکل ۵).



شکل ۵. تنظیمات دستگاه

حساسیت آنالیتیکال

حساسیت آنالیتیکالی کیت سین مورو HSV-1/2 غلظتی از HSV-1 DNA یا HSV-2 است که می تواند با نرخ مثبت $\leq 95\%$ شناسایی شود. حساسیت آنالیتیکال با تجزیه و تحلیل یک سری رقت از HSV-1 DNA و HSV-2 DNA با غلظت های مشخص تعیین شد. بر این اساس، حساسیت تحلیلی تعیین شده توسط آنالیز پروبیت، برای تشخیص HSV-1 DNA، 0.4 کپی / میکرولیتر (95% فاصله اطمینان) و حساسیت آنالیتیکال برای تشخیص HSV-2 DNA برابر با 2.5 کپی / میکرولیتر است (95% فاصله اطمینان).

اختصاصیت آنالیتیکال

اختصاصیت کیت سین مورو با طراحی دقیق پرایمرها و پروب ها تضمین می شود. پرایمرها و پروب ها با تمامی توالی های گزارش شده تا اطمینان حاصل شود که همه ژنوتیپ های HSV مربوطه شناسایی شده اند. علاوه بر این، اختصاصیت کیت با بررسی پنلی از DNA/RNA ژنومی استخراج شده از سایر ویروس های هرپس و سایر پاتوژن های مرتبط با بیماران مبتلا به نقص ایمنی مورد ارزیابی قرار گرفت.

Organism	Cycling Green (HSV-1)	Cycling Yellow (HSV-2)	Cycling Orange (IC)
Hepatitis A virus	-	-	+
Hepatitis B virus	-	-	+
Hepatitis C virus	-	-	+
Human immunodeficiency virus 1	-	-	+
Epstein-Barr virus	-	-	+
Cytomegalovirus	-	-	+
BK virus	-	-	+
Parvovirus B19	-	-	+
Human herpesvirus 6 (A, B)	-	-	+
Human herpesvirus 7	-	-	+
Human herpesvirus 8	-	-	+

نشانه ها

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temperature Limitation	محدودیت دمایی
	Consult Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficient for <n> tests	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 ۲۴ متری سعادت آباد،
خیابان حیدر نیا (دوم شرقی)، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی: ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ تلفن: ۲۲۰۸۲۱۲۰ پشتیبان فنی: ۰۹۳۰۱۸۲۱۶۰۱

تلفن های تماس : ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Web Site: www.Senmurv.co

Email: info@senmurv.ir