



Instruction for Use

H-Panel Detection RT-qPCR Kit

باروش

Real-Time PCR

Cat-No: BONH-Panel-24

Cat-No: BONH-Panel-96



Doc. #: IFU-H-Panel-01 Doc. Version: 01 Revision Date: 1404-04-18

فهرست مطالب

شماره فرانس	۳
شرح کیت	۳
اصول	۳
دامنه کاربرد	۳
محتویات کیت	۶
نگهداری و انتقال کیت	۷
نکات احتیاط عمومی	۷
هشدارها و محدودیت‌ها	۸
نمونه گیری و نگهداری	۹
عوامل تداخلی	۱۱
آماده سازی	۱۱
برنامه ریزی دمایی	۱۳
تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها	۱۵
آنالیز نتایج	۱۸
ارزیابی آنالیتیکال	۲۲
پشتیبانی فنی	۲۶
اطلاعات تماس	۲۷

- BONH-Panel-24
- BONH-Panel-96

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به صورت Real-Time ساخته شده است. پنل تشخیص H سین‌مورو دارای قابلیت شناسایی همزمان ۳ ویروس HIV-1 و HBV و HCV به صورت کیفی می باشد. کیت H-Panel RT-qPCR Senmurv 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 فلورسنت (Orange = Texas Red) صورت می‌پذیرد. آستانه تشخیصی آنالیتیکال این کیت در حضور IC کاهش نمی‌یابد. نتایج تشخیصی به دست آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص ویروس‌ها توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم ویروس‌های HIV-1، HBV و HCV می‌باشد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق رنگ‌های فلورسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلورسنت 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.

دامنه کاربرد

کیت طراحی شده به منظور تشخیص همزمان ۳ ویروس HIV-1 و HBV و HCV به صورت مولکولی و دقیق با استفاده از تکنیک Real-Time PCR توسعه یافته است. این کیت با هدف کاهش هزینه‌های تشخیصی، تسریع فرآیند غربالگری بیماران پرخطر و افزایش کارایی در مراکز درمانی و آزمایشگاهی طراحی شده است. تشخیص همزمان این سه ویروس به ویژه در بیماران دریافت‌کننده

خون، معتادان تزریقی، بیماران دیالیزی، و افرادی که در معرض خطر هستند، از اهمیت بالایی برخوردار است.

اطلاعات پاتوژن

ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV)

ویروس HIV یک ویروس رتروویروس (Retrovirus) از خانواده ی Retroviridae و جنس Lentivirus است که عامل بیماری سندرم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS) می باشد. دو نوع ویروس HIV مسئول انتقال این بیماری می باشد، HIV-1 و HIV-2 که در شدت و شیوع با یکدیگر تفاوت دارند. اکثر موارد گزارش شده ایدز در سراسر دنیا به ویروس HIV-1 نسبت داده شده است. ویروس HIV از طریق خون آلوده، مایع واژن، شیر مادر، و سایر مایعات بدن منتقل می شود. در این مایعات، ویروس HIV به دو صورت آزاد و درون سلول های ایمنی آلوده وجود دارد. سه مسیر اصلی انتقال این ویروس، رابطه جنسی محافظت نشده، سوزن های آلوده، و انتقال از مادر آلوده به کودک در هنگام تولد و یا از طریق شیر مادر است.

این بیماری یک وضعیت مزمن و پیش رونده است که با تضعیف تدریجی سیستم ایمنی بدن همراه بوده و خطر ابتلا به عفونت های فرصت طلب و بدخیمی ها را افزایش می دهد. ویروس HIV در ابتدا سلول های سیستم ایمنی مانند لنفوسیت های T را آلوده می کند، و این آلودگی منجر به کاهش سطح این سلول ها می گردد. هنگامی که این سلول ها، به خصوص سلول های لنفوسیت T دارای نشانگر $CD4^+$ به پایین تر از سطح بحرانی، کاهش می یابد، ایمنی از بین می رود و بدن به تدریج مستعد عفونت های فرصت طلب می شود. علائم ایدز در مرحله پیشرفته عفونت HIV رخ می دهد. وقتی که سیستم ایمنی بدن به خطر بیفتد دیگر نمی تواند با عفونت های فرصت طلب مقابله کند. در این مرحله، فرد آلوده به طور فزاینده علائمی را بروز می دهد که بر اثر چنین عفونت هایی ایجاد می شود. شایع ترین این عفونت ها شامل اسهال مزمن کریپتوسپوریدیا، عفونت چشم ناشی از سیتومگالوویروس، ذات الریه پنومونی، توکسوپلاسموز، و سل و همچنین عفونت های ناشی از مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس هستند. علاوه بر این، ظهور انواع مختلف سرطان از جمله سرطان تهاجمی گردن رحم، سارکوم کاپوزی و همچنین لنفوم به کرات گزارش شده است. در حال حاضر هیچ درمانی برای ایدز وجود ندارد و اعتقاد بر این است که بیشتر مبتلایان به HIV در نهایت در اثر یک بیماری مرتبط با ایدز خواهند مرد. از این رو HIV به عنوان یکی از چالش های مهم بهداشت عمومی

در جهان مطرح است. با این حال، پیشرفت‌هایی که در زمینه درمان ایدز از جمله مقابله مستقیم با ویروس و جلوگیری یا درمان عفونت‌های فرصت طلب انجام شده است، به طور چشمگیری منجر به افزایش امید به زندگی و کیفیت بسیاری از بیماران مبتلا به HIV و ایدز شده است.

ویروس هپاتیت B (HBV)

ویروس HBV یک ویروس DNA دورشته‌ای ناقص از خانواده‌ی Hepadnaviridae است که عامل بیماری هپاتیت B می‌باشد. ویروس هپاتیت B از طریق خون، فرآورده‌های خونی، تماس جنسی، بزاق، و انتقال از مادر به جنین منتقل می‌شود. دوره کمون بیماری حدود ۲ تا ۴ ماه است. علائم اولیه شامل تب، تهوع، استفراغ، زردی پوست و چشم، درد عضلانی، مشکلات گوارشی و خستگی است. در اکثر موارد، بیماری به صورت حاد گذرا باقی می‌ماند، اما حدود ۵ تا ۱۰ درصد بیماران وارد فاز مزمن می‌شوند. این بیماری می‌تواند حاد یا مزمن باشد و در صورت مزمن شدن، احتمال بروز سیروز کبدی، کارسینوم هپاتوسلولار (HCC) و نارسایی کبدی به شدت افزایش می‌یابد.

واکسیناسیون مؤثرترین راه پیشگیری از این بیماری است. تشخیص مولکولی DNA ویروس برای تأیید وجود عفونت فعال، ارزیابی پاسخ به درمان، و شناسایی مقاومت دارویی اهمیت بالایی دارد.

ویروس هپاتیت C (HCV)

ویروس HCV یک ویروس RNA تک‌ رشته‌ای، پوشش‌دار و با قطب مثبت از خانواده‌ی Flaviviridae و جنس Hepacivirus است. این ویروس دارای ۷ ژنوتیپ اصلی و چندین زیرگونه است. ژنوتیپ ۱ شایع‌ترین نوع در جهان محسوب می‌شود. ویروس از طریق خون آلوده، تزریقات غیربهداشتی، استفاده مشترک از سرنگ، دریافت خون آلوده یا تماس با تجهیزات پزشکی آلوده منتقل می‌شود. برخلاف HBV، هنوز واکسنی برای HCV وجود ندارد.

این ویروس عامل بیماری هپاتیت C است که اغلب به عفونت مزمن (حدود ۸۵٪ موارد) منجر شده و در صورت عدم درمان می‌تواند باعث فیبروز کبدی، سیروز، و سرطان کبد (HCC) شود. بیشتر بیماران بدون علامت هستند یا فقط علائم خفیفی مانند خستگی، تهوع، یا درد شکمی دارند. ارزیابی درمان با بررسی کاهش سطح RNA ویروس در خون انجام می‌شود. به دلیل تنوع ژنتیکی

بالا و نرخ جهش سریع این ویروس، تشخیص RNA ویروس از طریق روش‌های مولکولی برای شناسایی دقیق، تعیین ژنوتیپ، و پایش اثربخشی درمان‌های ضدویروسی ضروری است.

هم‌زمانی عفونت و اهمیت بالینی

هم‌زمانی عفونت با ویروس‌های HIV-1، HBV و HCV از لحاظ بالینی بسیار حائز اهمیت است، زیرا این پاتوژن‌ها مسیرهای انتقال مشترکی دارند. بیماران مبتلا به عفونت‌های هم‌زمان در معرض پیشرفت سریع‌تر بیماری، افزایش عوارض کبدی و پیچیدگی در درمان قرار دارند. همچنین، تداخلات دارویی و اختلال در پاسخ ایمنی می‌تواند مدیریت بالینی آن‌ها را دشوارتر کند.

بنابراین، تشخیص هم‌زمان و دقیق این ویروس‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی حساس و اختصاصی مانند Real-Time PCR برای تصمیم‌گیری درمانی صحیح و مدیریت بالینی بیماران ضروری است.

محتویات کیت

Title	24 Tests Volume per Vial
H-Panel Master-A	330 µl/tube × 1
H-Panel Master-B	30 µl/tube × 1
Internal Control	300 µl/tube × 1
Positive Control	100 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 بروی 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.
- ✓ 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 و RNA
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 Rotor-Gene, MIC با ۴ کانال فلوروسنت رنگ Green و Yellow و Orange و Red یا انتخاب فلورفورهای FAM و HEX و Texas Red و Cy5
۸. نرم افزار Rotor-Gene Q نسخه ۱/۷/۹۴ ، نرم افزار ۶۰۰۰ Rotor-Gene نسخه ۱/۷/۶۵ ،
۹. استریپ و کپ ۰/۱ ml برای استفاده در روتور ۷۲ چاهیکی

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.
۲. لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آن‌ها جلو ببرید.
۳. از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
۴. در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
۵. از سرسمپله‌های فیلتردار و RNase & DNase free استفاده نمایید.
۶. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای هر ۳ ویروس، نمونه‌های گرفته شده از مریض، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده سازی Master Mix صورت پذیرد.
۷. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.
۸. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به آرامی پیپتاژ نمایید و به طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طور کامل توصیه می‌شود.
۹. 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 مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.
۱۰. هنگام کار با مواد شیمیایی، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یکبار مصرف و عینک‌های محافظ داشته باشید.
۱۱. 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.
۱۲. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
۱۳. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
۱۴. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتر دار برای جلوگیری از ورود آلودگی DNA و RNA استفاده کنید.
۱۵. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یکبار مصرف بسته‌بندی کرده و به درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR را پس از اмпلی فای باز نکنید.
۱۶. از مواد یکبار مصرف، بیش از یک بار استفاده نکنید.

۱۷. مواد موجود در کیت که بلا استفاده هستند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به‌درستی دور انداخته شوند.

۱۸. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیمپت‌ها و تجهیزات را با اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ اسپری کنید.

نمونه‌گیری و نگهداری

۱. به‌منظور تشخیص همزمان ویروس های HIV-1، HBV و HCV 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 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 در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرد.

۳. نتایج منفی کاذب می‌توانند به دلیل حضور افزایش غلظت مهارکننده‌های واکنش PCR، نمونه‌گیری نامناسب، استخراج اسید نوکلئیک غیر استاندارد، 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 پلاسمای 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. نمونه‌های که ۴ روز یا بیشتر در دمای ۴-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده یا پلاسماهایی که در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر فریز نشده است قابل‌استفاده برای آزمایش نمی‌باشد.

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

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

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول 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 اِزاء 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 می‌کنیم باید در هنگام تخلیص پلاسما می 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 می‌باشد. این کنترل داخلی را می‌توان 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 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 1 میکرو لیتر کنترل داخلی به 15 میکرو لیتر مخلوط H-Panel Mastermix-A و B اضافه شده و سپس از این مخلوط مقدار 15 میکرو لیتر با 10 میکرو لیتر از نمونه تخلیص شده مخلوط می‌گردد.

عوامل تداخلی

حضور EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس (1 μ l)، خون (1 μ l)، اوره (40 گرم در 100 میلی‌لیتر) و بافر لیز موجب مهار واکنش PCR می‌شود. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل‌ردیابی است.

آماده‌سازی

آماده‌سازی با دو روش صورت می‌گیرد:

۱. در صورتی که کنترل داخلی را در مرحله استخراج و طی مراحل آماده‌سازی اضافه کرده‌اید، مقادیر لازم برای آماده‌سازی MasterMix برای هر واکنش را برای هرتست طبق جدول زیر آماده کنید.

Reagents	Volume
H-Panel Master-A	13.75 μ l
H-Panel Master-B	1.25 μ l
<u>Final Volume</u>	<u>15 μl</u>

جدول ۲. آماده‌سازی مخلوط واکنش (روش اول)

۲. اگر از IC فقط به‌عنوان یک کنترل‌کننده مهار RT-PCR استفاده شود، اما نه به‌عنوان یک کنترل‌کننده برای روش استخراج و آماده‌سازی نمونه، Master Mix را مطابق توضیح زیر تهیه نمایید:

در این حالت، ابتدا، ۱ میکرو لیتر از کنترل داخلی به مجموع مخلوط مستر A و B اضافه می‌شود و سپس از این مخلوط ۱۵ میکرو لیتر برای هر واکنش استفاده می‌گردد.

Reagents	Volume
H-Panel Master-A	13.75 μ l
H-Panel Master-B	1.25
Internal Control	1 μ l
<u>Final Volume</u>	<u>15 μl</u>

جدول ۳. آماده‌سازی مخلوط واکنش (روش دو)

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 کنترل مثبت و ۱۰ میکرو لیتر از نمونه های بیمار را به تیوب های مربوط به PTC و بیمار 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 µl
Sample or PTC	10 µl
<u>Total Volume</u>	<u>25 µl</u>

جدول ۴. افزودن الگو و نمونه ها

هشدارها و محدودیت ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP¹ توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ² (PPE) انجام شود. آزمایش های بالینی بر نمونه های 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 می شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین طور بعد از کار لامپ UV زده شود.

¹ Good Laboratory Practice

² Personal Protective Equipment

۳. پیشنهاد می‌شود محل استخراج اسید نوکلئیک، 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 نمونه 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.

برنامه ریزی دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های MIC و Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال‌های (Green ، Orange (Texas Red)، Red (CY5) و (FAM) و Yellow (HEX) نیز مناسب برای استفاده از این کیت هستند. به منظور انجام تست باید برنامه دمایی زیر برای دستگاه تعریف شود. سنجش طیف نشری (Acquisition) باید در کانال سبز (مربوط به سیگنال دریافتی از ژنوم HBV)، کانال نارنجی (مربوط به سیگنال دریافتی از کنترل داخلی)، کانال قرمز (مربوط به سیگنال دریافتی از ژنوم HCV) و همچنین کانال زرد (مربوط به سیگنال دریافتی از ژنوم HIV-1) 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
Reverse Transcription	50 °C	20 min	1
Pre-Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	20 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green (FAM), Orange (Texas red), Red (Cy5) and Yellow (HEX)	53 °C	60 sec	
Extension	72°C	20 sec	

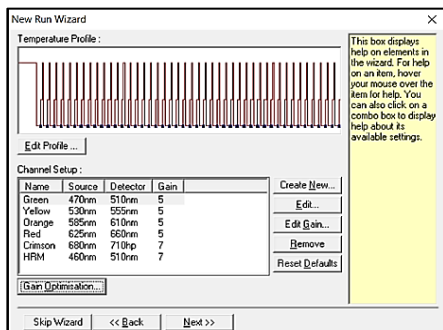
جدول ۵. برنامه ریزی دمایی

علاوه بر این، لازم به ذکر است که کانال Yellow کیت در صورت عدم وجود رنگ یا فلوروفور VIC در دستگاه Real-Time PCR مورد استفاده، قابلیت ستاپ و تنظیم با فلوروفورهای Joe نیز دارا است که می‌توانید برای پشتیبانی فنی و اطلاعات بیشتر با تلفن‌های شرکت تماس حاصل فرمایید.

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها

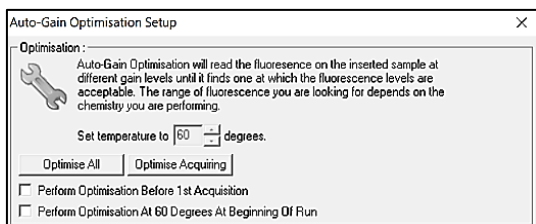
دستگاه Rotor-Gene

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



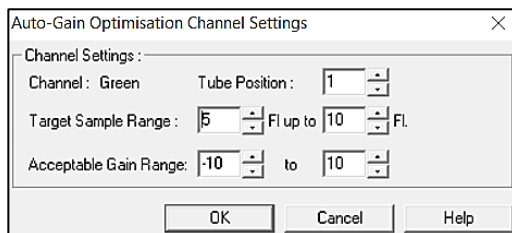
شکل ۱. تنظیمات دستگاه

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimize Acquiring برای هر ۴ کانال سبز، زرد، نارنجی و قرمز، بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



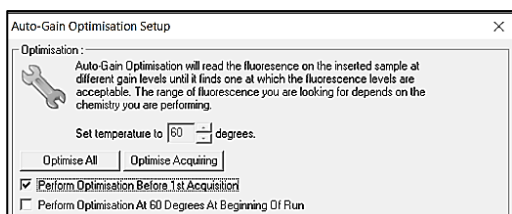
شکل ۲. تنظیمات دستگاه

همچنین Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب حاوی PTC انجام شود، بنابراین عدد نوشته شده در کادر Tube Position باید صحیح نوشته شده باشد (شکل ۳).



شکل ۳. تنظیمات دستگاه

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

تنظیم دستگاه Rotor-Gene جهت آنالیز نتایج

۱. آنالیز نتایج توسط نرم افزار 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.

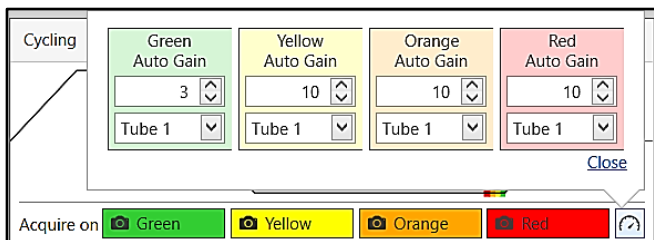
دستگاه MIC

بدین منظور در دستگاه MIC با انتخاب گزینه‌ی Run Profile پروفایل دمایی کیت را وارد کرده و در بخش cycling سنجش فلورسنت را در هر ۴ کانال فعال کنید (شکل ۵).

The screenshot displays the MIC software interface for configuring a temperature profile. On the left, the 'Hold' section contains two entries: 50.0 °C for 20:00 (min:sec) and 95.0 °C for 3:00 (min:sec). On the right, the 'Cycling' section includes a graph showing a temperature profile and a list of steps. The 'Acquire on' row shows Green, Yellow, Orange, and Red channels. The first step is set to 45 cycles, 95.0 °C for 20 s, with 'Touch Down' and 'Long Range' options. The second step is 53.0 °C for 60 s, and the third is 72.0 °C for 20 s. Buttons for 'Add Step' and 'Add Hold' are visible at the bottom.

شکل ۵. تنظیمات دستگاه

از آنجایی که Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب حاوی PTC انجام شود، با باز کردن پنجره‌ی تنظیمات Gain برای کانال‌های مختلف، در کادر مربوط به تیوب Gain، گزینه All tube را از حالت پیش فرض به جایگاه تیوب مورد نظر، تغییر دهید (شکل ۶).



شکل ۶. تنظیمات دستگاه

آنالیز اطلاعات

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

۱- سیگنال فلورسانس فقط در یکی از کانال های سبز و قرمز و زرد کاملاً مشخص است:

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

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

- سیگنال فلورسانس فقط در کانال (A.RED=CY5) کاملاً مشخص است.

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

- سیگنال فلورسانس فقط در کانال (A.HEX=yellow) کاملاً مشخص است.

نتیجه تست برای ویروس HIV-1 مثبت است و نمونه تخلیص شده از پلاسما حاوی این ویروس بوده است. در این حالت، وجود سیگنال فلورسانس در کانال (Orange=TEXAS RED) اهمیت ندارد زیرا در صورت بالا بودن غلظت اولیه ژنوم ویروس سیگنال در کانال Orange می‌تواند بسیار ضعیف باشد یا اصلاً وجود نداشته باشد.

۲- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال (A.FAM=Green channel)، (A.RED=CY5) و (A.HEX=yellow) مشاهده نمی‌شود. در همین حین سیگنال در کانال (Orange=TEXAS RED) مربوط به کنترل داخلی قابل مشاهده است. این حالت نشان‌دهنده عدم وجود ویروس در نمونه پلاسما می‌باشد. همچنین مثبت بودن سیگنال حاصل از کانال نارنجی وجود هرگونه مهارکننده واکنش PCR را منتفی می‌کند.

۳- هیچ سیگنال فلورسانسی در هیچ یک از کانال‌ها قابل مشاهده نیست. در این حالت هیچ‌گونه نتیجه‌گیری در مورد تست نمی‌توان انجام داد. تست باید دوباره تکرار شود.

۴- سیگنال فلورسانس در دو کانال (به همراه کانال IC یا بدون IC) کاملاً مشخص است. در این صورت نمونه برای کانال‌های دارای سیگنال فلورسنت، مثبت خواهد بود. در این حالت، وجود سیگنال فلورسانس در کانال (Orange=TEXAS RED) اهمیت ندارد زیرا در صورت بالا بودن غلظت اولیه ژنوم ویروس سیگنال در کانال Orange می‌تواند بسیار ضعیف باشد یا اصلاً وجود نداشته باشد.

جدول تفسیر نتایج

	Green (FAM)	Yellow (HEX)	Orange (ROX or TEXAS Red)	Red (CY5)
H-panel Master	HBV	HIV-1	IC	HCV

	Green (FAM)	Yellow (HEX)	Orange (ROX/ TEXAS Red)	Red (CY5)	Result
H-panel Master	+	-	-	-	HBV
	-	+	-	-	HIV-1
	-	-	+	-	IC
	-	-	-	+	HCV

جدول ۶. تفسیر نتایج

نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف

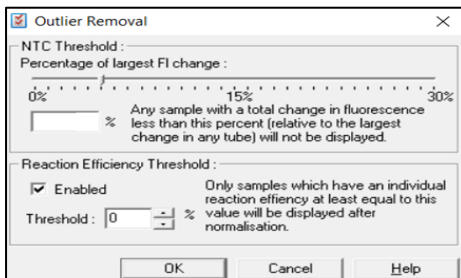
دستگاه Rotor-Gene

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

۱. از منوی Analysis, Quantitation را انتخاب کرده و روی یک رنگ، به‌طور مثال Green، دو بار کلیک کنید.

۲. با کلیک بر گزینه‌ی Outlier Removal، ترشلد افیشنسی واکنش را به شکل زیر فعال کنید (شکل ۷).

۳. آستانه (Threshold) را در کانال‌های Green, Orange و Yellow بر روی بازه‌ی مناسب (۰/۱-۰/۲) و بالاتر از فلورسانس نمونه‌ی منفی قرار دهید.



شکل ۷. تنظیمات دستگاه

دستگاه MIC PCR

آنالیز اطلاعات در دستگاه Magnetic Induction Cycler (Mic) PCR توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

۱. از منوی Analysis انتخاب کرده و روی یک رنگ، به‌طور مثال Non-Assay Green، کلیک کنید.

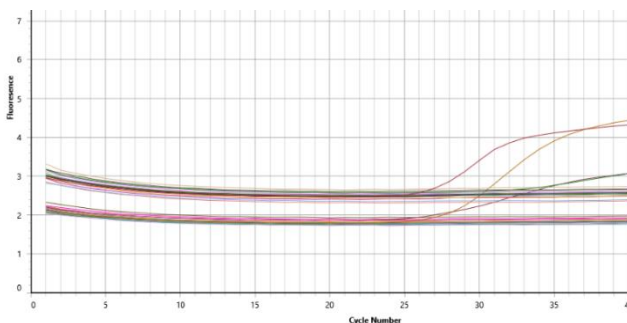
۲. در بخش Parameters به‌طور پیش‌فرض حالت Extensive برای Exclusion انتخاب‌شده است؛ و در بخش Fluorescence Cutoff Level بر ۵٪ تنظیم است. در غیر این صورت، این تنظیمات را وارد کنید

۳. انتخاب Threshold را به‌صورت اتوماتیک با فعال کردن گزینه‌ی Auto Set Threshold انجام دهید (شکل ۸).

Parameters	
Target: Non-Assay Green	Source Data: Cycling Green
Method: Dynamic	Ignore Cycles Before: 0
Threshold Start: 1.00	Auto Set Threshold: ☒
Exclusion: Extensive	Fluorescence Cutoff Level: 5.0%

شکل ۸. تنظیمات دستگاه

۴. مراحل بالا را برای کانال‌های دیگر Orange، Yellow و Red تکرار کنید.
۵. در صورت وجود نویز ابتدایی در بخش Data (شامل داده‌های خام) کانال موردنظر به شکل زیر، در بخش Parameters با قرار دادن عدد ۵ در کادر مقابل Ignore Cycles Before، سیکل ابتدایی را نادیده گرفت.



شکل ۹. تنظیمات دستگاه

ارزیابی آنالیتیکال

اختصاصیت آنالیتیکال

اختصاصیت کیت SENMURV H-Panel 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 ژنوتیپ‌های مرتبط از طریق همتراسازی توالی‌ها و همین‌طور توسط واکنش PCR بر روی دستگاه‌های Rotor-Gene برای هر کدام از ویروس‌ها روی ژنوتیپ‌های زیر مورد تأیید قرار گرفت.

	Virus Genotype	HBV Green (FAM)	Internal control Orange (TexasRED)	HCV Red (CY5)	HIV-1 Yellow (HEX)
HI Virus-1	A	-	+	-	+
HI Virus-1	B	-	+	-	+
HI Virus-1	C	-	+	-	+
HI Virus-1	D	-	+	-	+
HI Virus-1	E	-	+	-	+
HI Virus-1	F	-	+	-	+
HI Virus-1	G	-	+	-	+
HI Virus-1	H	-	+	-	+
HB Virus	A	+	+	-	-
HB Virus	B	+	+	-	-
HB Virus	C	+	+	-	-
HB Virus	C1	+	+	-	-
HB Virus	D	+	+	-	-
HB Virus	E	+	+	-	-
HB Virus	F	+	+	-	-
HB Virus	G	+	+	-	-
HC Virus	1a, 1b	-	+	+	-
HC Virus	2a, 2b	-	+	+	-
HC Virus	3a	-	+	+	-
HC Virus	4a,4d	-	+	+	-
HC Virus	5a	-	+	+	-
HC Virus	6a,6n	-	+	+	-

جدول ۷. ژنوتیپ‌های قابل تشخیص توسط کیت

بعلاوه، اختصاصیت کیت از طریق تست با ۱۰۰ نمونه مختلف پلاسمایی HIV-1 منفی / ۱۰۰ نمونه مختلف HCV منفی و ۱۰۰ نمونه مختلف منفی HBV تأیید شد. این نمونه‌ها هیچ سیگنالی که نشان‌دهنده حضور ویروس است، ایجاد نکردند.

واکنش دهی متقابل (cross-reactivity) کیت برای هر کدام از سه ویروس HIV-1، HCV و HBV با استفاده از گروه‌های کنترل مورد بررسی قرار گرفت. هیچ‌یک از پاتوژن‌های تست شده واکنش دهی (reactivity) نشان ندادند. هیچ‌گونه واکنش دهی متقابل در عفونت‌های مختلط ظاهر نشد.

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

جدول ۸. عواملی که در اختصاصیت آنالیتیکال HIV بررسی گشتند.

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 ۹. عواملی که در اختصاصیت آنالیتیکال HCV بررسی گشتند.

CONTROL GROUP	HBV	INTERNAL CONTROL
Herpes simplex virus 1	-	+
Herpes simplex virus 2	-	+
Epstein-Barr virus	-	+
Cytomegalovirus	-	+
Hepatitis A virus	-	+
Hepatitis C virus	-	+
Varicella-zoster virus	-	+
Escherichia coli	-	+
HIV1&2	-	+
Human T cell leukemia virus type	-	+
parvovirus B19	-	+

جدول ۱۰. عواملی که در اختصاصیت آنالیتیکال بررسی گشتند.

حساسیت آنالیتیکال (پایین ترین حد تشخیص)

محدوده تشخیص آنالیتیکال با در نظر گرفتن استخراج (محدودیت های تشخیصی) برای کیت مورد ارزیابی قرار گرفت. محدوده تشخیص کلینیکال با استفاده از نمونه های بالینی مثبت برای ویروس ها در کنار یک روش استخراج خاص تعیین می شود. در مقابل، محدوده تشخیص آنالیتیکال بدون استفاده از نمونه بالینی و مستقل از روش استخراج موردنظر، با استفاده از استانداردهایی با غلظت های معلوم تعیین می گردد.

حد تشخیص آنالیتیکال برای HBV با در نظر گرفتن خالص سازی، در دستگاه Rotor-Gene Q حدود 2.9 IU/mL می باشد. ($p = 0.05$). این به این معنی است که به احتمال ۹۵ درصد 2.9 IU/mL تشخیص داده می شود. حد تشخیص آنالیتیکال LOD کیت برای HCV بین ۶۰-۷۵ IU/mL به دست آمد. این بدین معناست که پارتیکل ویروسی با رقت بین ۶۰-۷۵ به احتمال ۹۵٪ قابل تشخیص هستند. محدوده تشخیصی آنالیتیکال HIV با در نظر گرفتن استخراج کیت توسط دستگاه Rotor-Gene 6000 حدود ۷۵ IU/mL است ($p = 0.05$). (= این بدان معناست که ۹۵٪ احتمال دارد که ۷۵ IU/mL مشاهده شود).

پشتیبانی فنی

جهت ارتباط با پشتیبانی فنی با شماره های زیر تماس حاصل فرمایید .

✓ ۰۹۹۳۶۶۹۳۹۴۱ (آقای قره داغی)

✓ ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

نشانه ها

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولیدشده
	Temperature Limitation	محدودیت دمایی
	Consult Instruction For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficient for <n> tests	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