دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کمی

Hepatitis C Virus (HCV)

با روش

RT-qPCR

STEM CELL TECHNOLOGY
شرکت فناوری بن یاخته

Doc. #: IFU-HCV-01 Doc. Version: 05 Revision Date: 03-05-2023

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۳

شرح کیت ۳

اصول ۳

اطلاعات پاتوژن ۳

محتویات کیت ۴

نگهداری و انتقال کیت ۴

نکات احتیاط عمومی ۵

هشدارها و محدودیت ها ۶

کنترل ها ۶

نمونه گیری و نگهداری ۷

کنترل داخلی ۷

در نهایت ۱۵µl از ۱۶µl توتال آماده شده را به هر میکروتیوب اضافه نمایید. ۸

آماده سازی ۸

اضافه کردن الگو ۹

برنامه ریزی دمایی ۹

آنالیز نتایج ۱۰

آنالیز اطلاعات ۱۰

رفع مشکل ۱۲

ارزیابی آنالیتیکال ۱۳

خطی بودن (Linearity) ۱۴

حساسیت و اختصاصیت کلینیکال ۱۶

پشتیبان فنی ۱۷

نشانه ها ۱۷

اطلاعات تماس ۱۷

شماره رفرانس

- BONHCV-24

شرح کیت

کیت Senmurv HCV RT-qPCR یک سیستم آماده مصرف برای تشخیص RNA ویروسHCV از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) روی ابزارهای Rotor-Gene Q است. مستر حاوی واکنش‌گرها و آنزیم‌هایی برای تکثیر اختصاصی قطعه ای به طولbp ۹۵ از ژنوم HCV بوده و برای تشخیص مستقیم امپلیکون مورد نظر از طریق کانال فلوروسنت Cycling Green در دستگاه‌هایRotor-Gene ۳۰۰۰ و Rotor-Gene ۶۰۰۰ 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 Cycling Yellow صورت می‌پذیرد.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم پاتوژن است. در واکنش Real-time PCR محصول تکثیر شده 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 لوله های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

اطلاعات پاتوژن

ویروس هپاتیت (HCV) عضوی از خانواده Flaviviridae است که از ۷ ژنوتیپ تشکیل شده است. این ویروس کوچک (۴۵ نانومتر) دارای ژنوم RNA تک رشته ای به طول تقریباً ۹/۶ کیلوبایت است. توزیع جغرافیایی ۷ ژنوتیپ مختلف بر اساس منطقه متفاوت است که به موجب آن ژنوتیپ a۳ رایج ترین است.

انتقال از طریق خون، رایج ترین حالت عفونت است که از طریق روشهای تزریق غیر ایمن، استریلازیسیون ناکافی تجهیزات پزشکی در محیط های مراقبت های بهداشتی و خون و محصولات خونی غربال نشده صورت میگیرد.

تظاهرات بالینی در بیماری HCV به صورت بیماری حاد و مزمن بروز پیدا می کند. بیشتر افراد مبتلا به بیماری حاد علامت دار هستند و از عفونت خود اطلاع ندارند. خطر ابتلا به بیماری مزمن پس از عفونت حاد بسیار زیاد است (۵۵٪ - ۸۵٪). عفونت های HCV یکی از دلایل اصلی بیماری مزمن کبدی در سراسر جهان

است. عفونت مزمن HCV معمولاً به آرامی پیشرفت می کند و اکثر بیماران بدون علامت هستند یا فقط علائم خفیف غیر اختصاصی 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 می شوند. علائم مرتبط با سیروز عبارتند از: هپاتومگالی یا اسپلنومگالی در معاینه فیزیکی، افزایش غلظت بیلی روبین سرم و یا هیپرآلبومینمی.

در درمان HCV هدف اصلی بهبود عفونت است، یعنی دستیابی به یک پاسخ ویروسی پایدار (SVR) تعریف شده به عنوان سطح HCV RNA غیرقابل شناسایی پس از اتمام درمان. بنابراین، اثربخشی مکانیسم درمانی با اندازه گیری سطح HCV RNA در بازه های زمانی خاص، با استفاده از یک روش حساس مولکولی بررسی می شود.

محتویات کیت

Title	24 Tests
HCVMaster-A	330 µl/tube
HCVMaster-B	30 µl/tube
Std1 : $5x10^4$	200 µl/tube
Std2 : $5x10^3$	200 µl/tube
Std3 : $5x10^2$	200 µl/tube
Std4 : $5x10^1$	200 µl/tube
Internal control	300 µl/tube
Nuclease-Free Water	250 µl/tube

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. بیش از دو مرتبه منجمد و آبکردن کیت به هیچ وجه توصیه نمیگردد زیرا میتواند باعث کاهش در حساسیت کیت گردد. نگهداری کیت در دمای۴ درجه سانتی گراد هیچگاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.

مواد و تجهیزاتی که باید توسط کاربر تهیه شوند :

۱. کیت استخراج RNA
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه هاش مختلف و نوك سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزي
٤. بلوك خنك كننده
٥. وایتکس ۱۰ درصد
٦. گان و دستکش
۷. لوله های ۰/۲ و ۰/۱میکرولیتر
۸. دستگاه Rotor-Gene با کانال‌های فلوروسنت مخصوص Cycling Green و Cycling Yellow و یا Cycling A.FAM و Cycling A.HEX(JOE)
۹. نرمافزار Rotor-Gene Q (نسخه ۱/۷/۹٤ (نرمافزار Rotor-Gene ٦۰۰۰ (نسخه ۱/۷/٦٥, ۱/۷/۸۷, ۱/۷/۹٤) و نرم افزار) Rotor-Gene ۳۰۰۰ نسخه ٦/۰/۲۳ یا بالاتر)
۱۰. استریپ و کپ ۰/۱ ml برای استفاده در روتور ۷۲ چاهکی (شماره کاتالوگ ۹۸۱۱۰۳ و یا ۹۸۱۱۰٦)
۱۱. در غیر این صورت: لوله‌های PCR 0.2 ml برای روتورهای ۳٦ چاهکی (شماره کاتالوگ ۹۸۱۰۰٥ و یا ۹۸۱۰۰۸)

نکات احتیاط عمومی

۱. استفاده از سر سمپلرهای فیلتردار وRNase & DNase free
۲. نگهداریوتخلیص مثبت برای هپاتیت Cنمونه هایگرفته شده از مریض کنترلها و محصولات حاصل از PCR باید درمحلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده سازی Master Mixصورت پذیرد.
۳. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
٤. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد (به ویژه استانداردهای کیت) را به خوبی پیپتاژ نمایید و به طور مختصراسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکردکیت در طی زمان به طور کامل توصیه میشود.

۵. تمام مراحل مربوط به تهیه Master Mix باید بر روی یخ یا جعبه های 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.

٦. هنگام کار با مواد شیمیائي، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهي، دستکش یکبار مصرف، وعینکهاي محافظ داشته باشید.

هشدارها و محدودیت ها

۱. کلیه نمونه ها عفونی بوده بنابراین تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP[1] توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ PPE)[2])انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-۲ 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 .

۳. پیشنهاد می شود محل استخراج RNA ، آماده سازی مخلوط واکنش از فضای آماده کردن اضافه کردن نمونه و نمونه استاندارد جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید .

٤. پس از آماده سازی مخلوط واکنش ، آن را در تاریکی نگهداری نمایید .

کنترل ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک حاصل از استخراج RNA 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.

---

[1] Good Laboratoty Practice

[2] Personal Protective Equipment

نمونه گیری و نگهداری

۱. برای امر تشخیص و تعیین مقدار ویروس هپاتیت C می توان نمونه های متفاوتی از جمله پلاسما، سرم، مایع مغزی نخاعی و غیره را مورد استفاده قرار داد، اما معمول ترین نمونه مورد استفاده نمونه پلاسما می باشد.

۲. نمونه خون گرفته شده باید در اسرع وقت (کمتر از شش ساعت از زمان نمونه گیری) پلاسما گیری شود. برای این منظور نمونه خون را به مدت ۲۰ دقیقه درg۱۶۰۰-۸۰۰ 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 می توان بدون آسیب به ژنوم ویروس برای روزها در٤ درجه سانتی گراد ، هفته ها در ۲۰- درجه سانتی گراد و ماه ها و حتی سال ها در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرد.

۳. نتایج منفی کاذب می‌توانند به دلیل حضور افزایش غلظت مهار کننده های واکنش PCR، نمونه‌گیری نا مناسب، استخراج RNA غیر استاندارد، انتقال نامناسب نمونه و یا از غلظت کم نمونه ناشی گردد.

٤. اگرچه هپارین یکی از پر کاربردترین مواد ضد انعقاد میباشد به هیچ عنوان نباید برای نمونه های خونی که برای آنالیز توسط این کیت مورد استفاده قرار میگیرد به کار رود.

۵. اگر احتمال تاخیر در استخراج نمونه ها وجود دارد، آنها را در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایینتر نگهداری نمایید.

٦. نوکلئیک اسیدهای استخراج شده باید در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایین تر نگهداری شوند.

۷. نمونهای که ٤ روز یا بیشتر در دمای ٤-۲ درجه سانتیگراد نگهداری نشده یا در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایین تر فریز نشده است قابل استفاده برای آزمایش نمیباشد.

- ایمنی زیستی در آزمایشگاه های میکروبیولوژی و زیست-پزشکی چاپ پنجم

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

کنترل داخلی

این کیت به همراه یک کنترل داخلی برای مصرف کننده نهایی تهیه شده است. این امر به کاربر نهایی اجازه میدهد 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 ۰/۲ میکرولیتر به ازاء هر۱ میکرولیتر از حجم حل کردن نهایی ژنوم ویروس هپاتیت C اضافه می شود. برای مثال اگر ژنوم تخلیص شده از هپاتیتC را در۵۰ میکرولیترآب حل میکنیم باید در هنگام تخلیص پلاسمای مربوط به آن به پلاسما ۱۰ میکرولیترکنترل داخلی اضافه کنیم. به بیان دیگر حجم کنترل داخلی اضافه شده تنها تابعی از میزان الوشن (Elution) نهایی می باشد. این کنترل داخلی را می توان به طور مستقیم به بافر لیز اضافه کرد و یا آن را به مخلوط بافر لیز و پلاسما

اضافه نمود. این نکته قابل ذکر است که اضافه کردن کنترل داخلی به بافر لیز یا 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 بافرلیز 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 میکرولیترکنترلداخلی به ۱۵ میکرولیتر MasterMix-HCV اضافه شده و سپس از این مخلوط مقدار ۱۵ میکرولیتر با ۱۰ میکرولیتر از نمونه تخلیص شده مخلوط می گردد.

اگر از IC به عنوان یک کنترلکننده مهار RT-qPCR استفاده می شود و نه به عنوان یک کنترل برای روش آماده سازی نمونه، مقدار نهایی برای هر لوله تست یا استاندارد را مطابق جدول زیر تنظیم کنید.

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

در نهایت ۱۵µl از ۱٦µl توتال آماده شده را به هر میکروتیوب اضافه نمایید.

آماده سازی

در صورتیکه کنترل داخلی را در مرحله استخراج اضافه کرده اید، مقادیر لازم برای آماده سازی هر لوله تست یا استاندارد را مطابق جدول زیر آماده کنید.

Title	Volume
HCVMaster-A	13.75 µl
HCVMaster-B	1.25 µl
Total	15 µl

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

اضافه کردن الگو

پس از آماده سازی محلول‌ها و انتقال آن به تیوب‌های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۱۰ میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسیدنوکلئیک، ۱۰ میکرولیتر از نمونه استاندارد و۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

Reaction Setup	Volume
Total MasterMix	15 µl
Sample or Standard	10 µl
Final Volume	25 µl

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 زرد (مربوط به سیگنال دریافتی از کنترل داخلی) انجام شود. مقادیر دمایی هر قسمت در کادر زیر آورده شده است.

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

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

آنالیز نتایج

تعیین تعداد ژنوم ویروس هپاتیتC تخلیص شده:

استانداردهای تامین شده در این کیت معادل یک نمونه تخلیص شده با تعداد کپی ویروس کاملا مشخص است. از آنجا که از هر نمونه تخلیص شده مقدار ۱۰ میکرولیتر از ژنوم تخلیص شده با ۱۵میکرولیتر از Total MasterMix مخلوط میشود باید همین روند به طور مشابه برای نمونههای 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 کشیدهشده 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 به نرم افزار دستگاه وارد شود.

✓ استانداردهای تامین شده در کیت به صورت $IU/\mu l$ میباشد. برای تبدیل این استانداردها به IU/ml از رابطه زیر استفاده کنید.

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

آنالیز اطلاعات

حد آستانه (Threshold) را بر روی Baseline و در Th= ۰/۰۲ قرار دهید. سپس نتایج را به صورت زیر تفسیر کنید:

۱- سیگنال فلورسانس در کانال (A.FAM=Green Channel) کاملا مشخص است.

نتیجه تست برای ویروس مثبت است و نمونه تخلیص شده از پلاسما حاوی ویروس هپاتیت C بوده است. در این حالت، وجود سیگنال فلورسانس در کانال Yellow (HEX) اهمیت ندارد زیرا در صورت بالا بودن غلظت اولیه ژنوم ویروس هپاتیتC سیگنال در کانال Yellow (HEX) میتواند بسیار ضعیف باشد یا اصلا وجود نداشته باشد.

۲- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال (A.FAM=Green Channel) مشاهده نمیشود. در همین حین سیگنال در کانال Yellow (HEX) مربوط به کنترل داخلی قابل مشاهده است.

این حالت نشان دهنده عدم وجود ویروس هپاتیتC در نمونه پلاسما میباشد. همچنین مثبت بودن سیگنال حاصل از کانال Yellow (HEX) وجود هر گونه مهار کننده واکنشPCR را منتفی میکند.

۳- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال A.FAMو کانال Yellow (HEX) قابل مشاهده نیست.
در این حالت هیچ گونه نتیجه گیری در مورد تست نمیتوان انجام داد. تست باید دوباره تکرار شود.

تفسیر	نتایج
نتیجه در محدوده آزمایش تعیین شده است. احتمال تشخیص HCV RNAبیش 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 <75 IU/ml
هیچ HCV RNAشناسایی نشد.	HCV RNA negative

رفع مشکل [3]

	مشکل	دلیل بروز مشکل	اقدام اصلاحی
1	هیچ سیگنالی دریافت نشده ولی کنترل مثبت سیگنال دارد.	استخراج RNA	استخراج RNA با برخی از کیت ها ممکن است همراه با برخی ناخالصی هایی باشد که با مسترمیکس واکنش مهاری دهد
2	هیچ سیگنالی از هیچ کانالی دریافت نمی شود (حتی در نمونه استاندارد و کنترل داخلی کیت نیز هیچ سیگنالی رویت نشده)	مشکل از مستر میکس می باشد	واکنش را مجدد روی کنترل مثبت کیت تکرار کنید تا از مشکل مسترمیکس اطمینان حاصل کنید.
		مشکل از دستگاه یا نرم افزار آن می باشد	از نحوه run دستگاه و همچنین سلامت دستگاه اطمینان حاصل کنید.
3	رویت سیگنال در نمونه کنترل منفی	آلودگی فضای هود یا work station که میکس اولیه آماده می گردد.	با سفیدکننده ۱۰٪ تمام سطوح هود را تمیز کنید و به مدت ۲۰ دقیقه سفید کننده ۱۰٪ بگذارید روی سطوح بماند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه UV را روشن کنید.
		مشکل از سمپلر آلوده یا مشترک می باشد	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 میکنید 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 مسترمیکس ها را الکوت کنید در غیر این صورت اگر طی دو یا سه روز کل کیت مصرف می شود مسترمیکس ها را در دمای ٤ 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 سیگنالهای خطی (noise)	نرم افزار دستگاه	برای دستگاه Qiaqen (کوربت) گزینه outlier removal را طبق شرایط بهینه نمونه روی ۵٪ بگذارید.

[3] Troubleshooting

ارزیابی آنالیتیکال

اختصاصیت آنالیتیکال این کیت برای شناسایی اختصاصی ویروس هپاتیتC در درجه اول به واسطه مطالعات کامل و دقیق بیوانفورماتیکی که در مورد طراحی پرایمر و پروب آن به کار بسته شد تامین گردید.

کیت Senmurv HCV RT-qPCR با هیچ یک از عوامل بیماری زا زیر واکنش نشان نمی دهد:

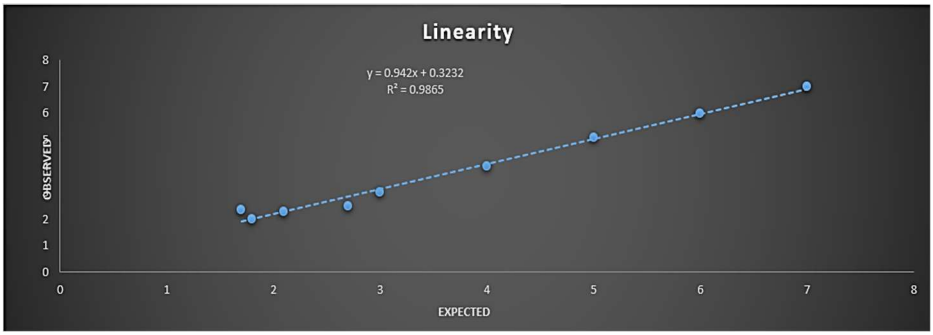
CONTROL GROUP	HCV	INTENAL CONTROL
Herpes simplex virus 1	-	+
Herpes simplex virus 2	-	+
Epstein-Barr virus	-	+
Cytomegalovirus	-	+
Hepatitis A virus	-	+
Hepatitis B virus	-	+
Hepatitis D virus	-	+
Hepatitis E virus	-	+
Varicella-zoster virus	-	+
Escherichia coli	-	+
HIV1&2	-	+
Human T cell leukemia virus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

برای تعیین حساسیت آنالیتیکال کیتHCV qRT-PCR ، یک سری رقت ویروس HCV از IU/mL ۵۰ تا۱۰ IU/ mL^{7} ایجاد گردید و با استفاده از کیت HCV qRT-PCR و با دستگاه‌هایRotor-Gene موردارزیابی قرارگرفت. این آزمایش در سه روز و در هشت تکرار صورت پذیرفت و نتایج از طریق آنالیز تعیین شدند. از آنجا که آخرین رقتی که به صورت ۱۰۰٪ خوانش گردید بین ۵۰-۵۰۰ IU/ml بود، رقتهای پایین آن را به صورت IU/mL ۱۲۵، ۱۰۰، ۷۵ ، ۶۰،۵۰ ، تهیه گردید و در ۲۰ تکرار رقتها بررسی شدند. رقت IU/mL ۷۵ به صورت ۱۰۰٪ مثبت تشخیص داده شد ولی رقت IU/mL ۶۰ تنها در ٦٦٪ موارد شناسایی گردید. بنابراین LOD کیت بین IU/mL ۶۰-۷۵ به دست آمد. این مقدار بنابراین به عنوان LOD گزارش گردید.

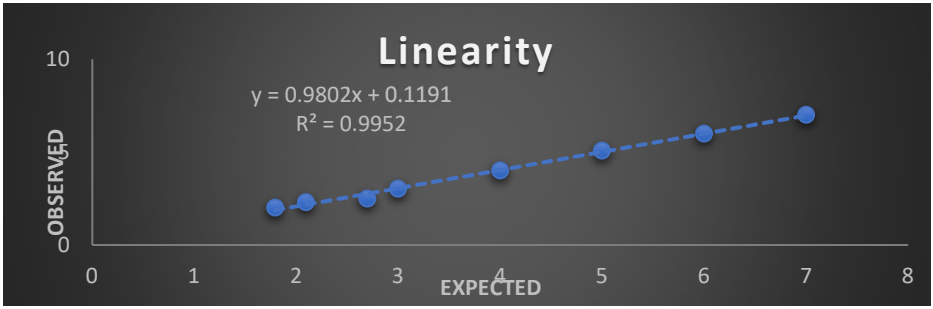
خطی بودن (Linearity)

هدف تخمین بازه غلظتی که در این بازه دادههای حاصل از سنجش کمی ویروس دارای رفتار خطی بر روی منحنی آنالیز آن باشد. مطابق EP A-6، برای استانداردها در طول ۵ روز به صورت دابلیکیت، ریل تایم گذاشته شد. سپس خطی بودن استانداردها بررسی گردید.

Linearity		
IU/ml	**Expected**	**Observed**
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



شکل ۱: نتایج خطی بودن کیت در بازه ۵۰ تا۱E7 IU/ml



شکل ۲: نتایج خطی بودن کیت در بازه ۱۰۰تا ۱E7 IU/ml

بر اساس مقایسه دو گراف فوق این مطلب قابل دستیابی است که linearity تست در بازه IU/ml ۱۰۰ الی ۱E7 IU/ml با۰/۹۹۵ =۲R و شیب خط برابر با ۰/۹۹ قابل قبول است.

حساسیت و اختصاصیت کلینیکال

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:

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

بررسی حساسیت و اختصاصیت کیت

حساسیت کیتSenmurv HCV RT-qPCR در مقایسه با کیت رفرنس Altona HCV RT-qPCR kit 2.0 ٪۹۸ و اختصاصیت آن ۱۰۰٪ ارزیابی گردید.

پشتیبان فنی

برای پشتیبانی فنی لطفا با تلفن های شرکت تماس حاصل فرمایید .

نشانه ها

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

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته -گروه سین مورو

،دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار 24 متری سعادت آباد

خیابان حیدرنیا (دوم شرقی)، پلاک 9، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی: 1997775555 پشتیبان فنی : 09301821601

تلفن های تماس : 02122082120

Web Site : www.Senmurv.co Email : info@senmurv.ir