دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

HSV-2 و HSV-1 ویروس

Real-Time PCR با روش

Doc. #: IFU-HSV 1/2 Doc. Version: 03 Revision Date: 05-06-2022

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۳
شرح کیت ۳
اصول ۳
اطلاعات پاتوژن ۳
محتویات کیت ۴
نگهداری و انتقال کیت ۵
نکات احتیاط عمومی ۶
هشدارها و محدودیت‌ها ۷
نمونه‌گیری و نگهداری ۸
عوامل تداخلی ۹
آماده سازی ۹
اضافه کردن الگو ۱۰
برنامه ریزی دمایی ۱۰
آنالیز نتایج ۱۳
نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف ۱۴
نشانه ها ۱۶
اطلاعات تماس ۱۶

شماره رفرانس

- BONHSV1/2-24

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورتReal-Time ساختهشدهاست. این محصول برای تشخیص در شرایط آزمایشگاهی و برای تشخیص ویروس HSV-1وHSV-2 تهیه شده است. نتایج تشخیصی به‌دست‌آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم ویروس میباشد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق فلوروسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به بازکردن مجدد لولههای واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد. 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 HSV-1 و HSV-2 به ترتیب با فلوروفور هایFAMو 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

ویروس‌های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ (HSV-1وHSV-2) از مهم‌ترین ویروس‌های بیماری‌زای انسانی و دو عضو بسیار مهم از خانواده‌ی Herpesviridae هستند و همراه با ویروس Varicella-zoster (VZV)، تحت عنوان alphaherpesviridae طبقه بندی می شوند. HSV-1وHSV-2 دارای ژنوم DNA دو رشته ای خطی و به طول تقریبی ۱۵۰kbp هستند که با یک کپسید پروتئینی با تقارن

۲۰ وجهی احاطه شده‌اند و در بیش از ۸۰٪ ناحیه‌ی کدکننده‌ی 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 می‌شوند. شیوع عفونت HSV-2 به تدریج از دوران کودکی افزایش می‌یابد و در سال‌های بعد به ۸۰ درصد و بیشتر می‌رسد، در حالی که تا نوجوانی، نمونه‌های خونی کمی از مبتلایان، HSV^+ می‌شوند.

اکثر عفونت های اولیه‌ی HSV-1به صورت عفونت های خفته یا ناشناخته بروز پیدا می‌کنند. عفونت های اولیه با HSV-2 به طور معمول به صورت تبخال تناسلی ظاهر می شوند. عفونت اولیه با HSV-1یا HSV-2، تاخیر در ایجاد گانگلیون ریشه پشتی را به دنبال دارد. به طور دوره‌ای، ویروس دوباره فعال می‌شود و از طریق آکسون عصبی به محل‌های دهان یا تناسلی می‌رود، در نتیجه ویروس عفونی آزاد شده و در برخی موارد، ضایعه ایجاد می‌شود.

محتویات کیت

Title	24 Tests
MasterMix HSV-1/2	360 µl/tube × 1
Positive Control	50 µl/tube × 1
Internal Control	200 µl/tube × 1

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداریگردد، همچنین به منظور انتقال و جابهجایی کیت از یونولیت با درب و یخخشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچگاه نباید بیشتر از یکساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل برروی 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 درنتیجه 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 نوك سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزي
٤. بلوك خنك كننده
٥. وایتکس ۱۰ درصد
٦. 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 درحینکار 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 سرسمپلرهای فیلتردار وRNase & DNase free

۳. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای نمونههای گرفته شده از بیمار، کنترلها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده سازی MasterMix صورت پذیرد.

٤. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.

٥. 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 بهطورکامل توصیه میشود.

٦. 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 شیمیائي، روپوش مناسب آزمایشگاهي، دستکش یکبار مصرف، وعینکهاي 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 کاملا جدا کنید.

۹. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند 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 بپرهیزید.

۱٤. مواد موجود درکیت که بلا استفاده شدند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.

۱٥. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ۷٥٪ و وایتکس ۱۰٪ تمیز کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. 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-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.

٤. 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 به‌جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

---

[1] Good Laboratoty Practice

[2] Personal Protective Equipment

نمونه‌گیری و نگهداری

نمونه مورد نیاز می تواند 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 بخش های تناسلی، نمونه های تنفسی نظیر ترشحات برونش، نازوفارنکس و نایی، BAL و بزاق، بافت های 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.

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 مهاری 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 ۲۰- °C نگهداری کنید. سایر نمونه‌های مورد استفاده را نیز طی چند ساعت اولیه پس از نمونه‌گیری در دمای ۲۰- °C نگهداری و از فریز و ذوب کردن مکرر آن‌ها خودداری نمایید.
٤. در صورت حمل و نقل نمونه، نمونه را در شرایط سرد و همراه یخ منتقل کنید.
٥. در صورت نبود شرایط برای انتقال نمونه در ٢٤ ساعت اولیه، نمونه را در ۲۰- °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.

توجه: در صورت استفاده از نمونه CSF و مایعات بدون بافت مقدار مقدار$0.2\mu l$ به ازاء هر $1\mu l$ از حجم حلال نهایی نوکلئیک اسید اضافه میشود. برای مثال اگر نوکلئیک اسید تخلیص شده را در $50\mu l$ آب حل میکنیم باید در هنگام تخلیص نمونه به آن $10\mu l$ کنترل داخلی اضافه کنیم.

عوامل تداخلی

(EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس ($1\mu l$)، خون ($1\mu l$)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) 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.

آماده سازی

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

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

۳. مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه اسید نوکلئیک جدا شده یا ۵ 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 موادبالینی منفی می‌توان به‌عنوان کنترل جداسازی منفی استفاده کرد.

٤. 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 اضافه‌کردن مستر واکنش و نمونه‌های بیمار استفاده کرد و همچنین در نظر داشته باشید که در ویالکنترل 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 محلول‌ها و انتقال آن به تیوب‌های 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 اسیدنوکلئیک، ۵میکرولیتر از کنترل مثبت و۵میکرولیتر 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
Master Mix	15 µl
Sample or Control	5 µl
Final Volume	20 µl

برنامه ریزی دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های ABI StepOne و Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال Green, Yellow, Orange نیز برای استفاده از اینکیت مناسب هستند. پس از تنظیمکردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. درصورت 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

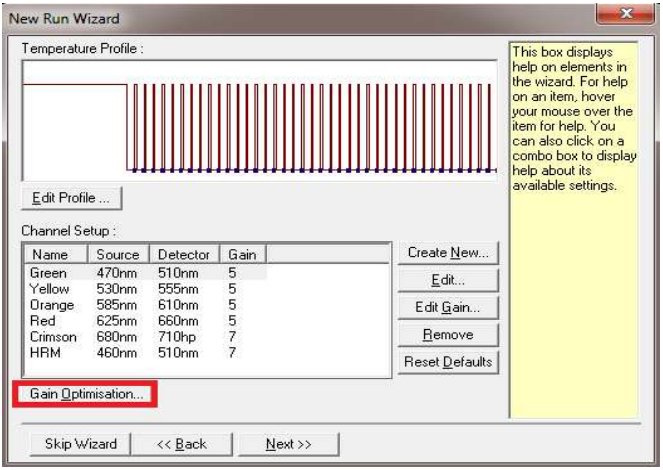
	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 ℃	4 min	1
Denaturation	95 ℃	15 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green,Yellow, Orange	60 ℃	45 sec	

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

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌های مختلف:

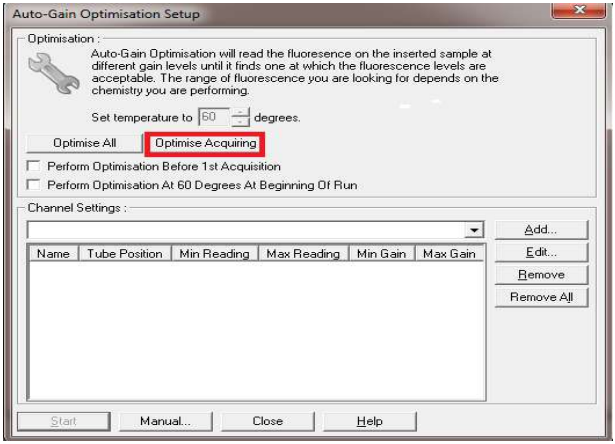
دستگاه Rotor-Gene:

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

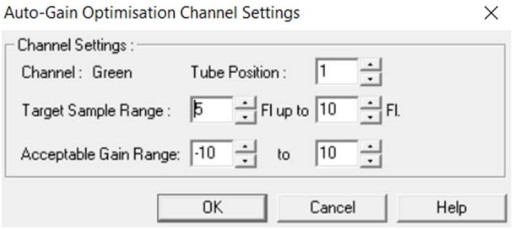


شکل ۱. تنظیمات دستگاه

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

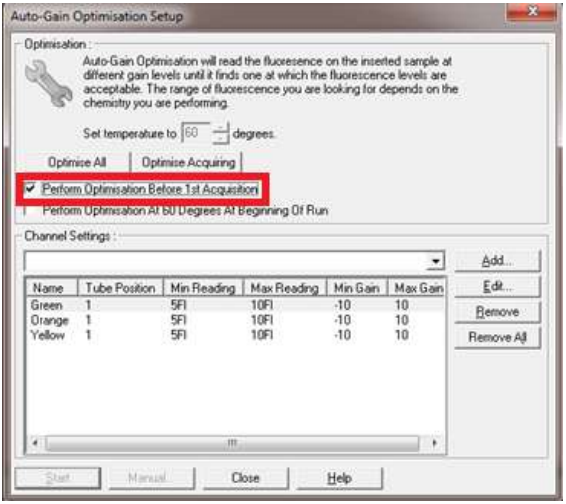


شکل ۲. تنظیمات دستگاه



شکل ۳. تنظیمات دستگاه

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisation را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ٤).



شکل ٤. تنظیمات دستگاه

آنالیز نتایج

۱.آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در۳ کانال رنگی Yellow (HEX) ، Green(FAM)و Orange (Texas Red) پس از قرار آستانه (Treshold)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 کانال‌هایفلورسانس مشخصمی‌کند کدام تایپ HSV در نمونه وجود دارد.

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

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

۱. نمونه زمانی مثبت می‌شود که دارای دو شرط زیر باشد.

A. دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد.

B. Ct HSV-1و HSV-2 کمتر از ۴۰ باشد.

با توجه به موارد بالا، نتیجه منفی یک نمونه، مستلزم داشتن IC با $\leq$ ۳۰CT 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-1و2-HSV** ، نمونه دارای هر دو واریانت **HSV-1وHSV-2** می باشد. در اختلاف بیشتر از ۳ سیکل ، ویروس با سیکل آستانه ای کمتر مثبت می باشد.

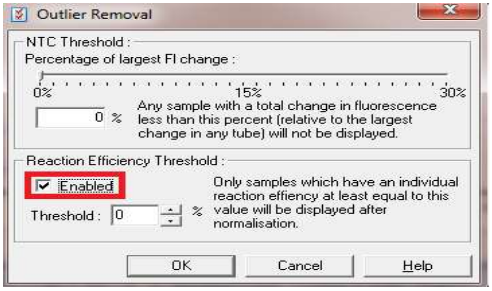
نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف

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 یکرنگ، به طور مثال Green، دوبار کلیک کنید.

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



شکل ۵. تنظیمات دستگاه

حساسیت آنالیتیکال

حساسیت آنالیتیکالی کیت سین مورو HSV-۱/۲ غلظتی از DNA HSV-1یا HSV-2 است که می تواند با نرخ مثبت ≥ ۹۵ % شناسایی شود. حساسیت آنالیتیکال با تجزیه و تحلیل یک سری رقت از DNA HSV-1و HSV-2 DNA با غلظت های مشخص تعیین شد. بر این اساس، حساسیت تحلیلی تعیین شده توسط آنالیز پروبیت، برای تشخیص DNA HSV-۱، ۰٫٤ کپی/ میکرولیتر (۹۵٪ فاصله اطمینان) و حساسیت آنالیتیکال برای تشخیص DNA HSV-2 برابر با ۲٫۵ کپی/ میکرولیتر است (۹۵٪ 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 ویروس‌های هرپس و سایر پاتوژن‌های 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
REF	Catalog Number	کد کالا
LOT	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Concult Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficent 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 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