راهنما دفترچه

کیت شناسایی و سنجش کیفی

EBVویروس

با روش

Real-Time PCR

Doc. #: IFU-EBV-00 Doc. Version: 00 Revision Date: 07-01-2023

شرح کیت..... ۳
اصول..... ۳
اطلاعات پاتوژن ٤
محتویات کیت..... ٤
نگهداری و انتقال کیت ٤
نکات احتیاط عمومی..... ٥
هشدارها و محدودیت ها..... ٦
کنترل ها..... ٦
نمونه گیری و نگهداری ٦
ارزیابی آنالیتیکال ۱۰
اختصاصیت آنالیتیکال ۱۰
ارزیابی کلینیکال..... ۱۲
پشتیبان فنی ۱۲
نشانه ها..... ۱۲
اطلاعات تماس..... ۱۳

شماره رفرانس

- BONEBV-24

شرح کیت

کیت Senmurv EBV-PCR یک سیستم آماده مصرف برای تشخیص DNA ویروسEBV از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) روی دستگاه‌های Rotor-Gene Q است. مستر EBV حاوی واکنش‌گرها و آنزیم‌های لازم برای تکثیر اختصاصی قطعه ای به طول ۹۷ جفت باز از ژنوم EBV بوده و برای تشخیص مستقیم امپلیکون مورد نظر از طریق کانال فلورسنت Cycling Green در دستگاه‌های Rotor-Gene ۳۰۰۰ و Rotor-Gene ٦۰۰۰ طراحی گردیده است.

بعلاوه، کیت Senmurv EBV-PCR حاوی سیستم ثانویه تکثیر هترولوگ برای تشخیص احتمال وجود مهارکننده واکنش PCR است. این امر از طریق شناسایی کنترل داخلی در کانال فلوروسنت Cycling Yellow در دستگاه‌هایRotor-Gene ۳۰۰۰ وRotor-Gene ٦۰۰۰ صورت می‌پذیرد. آستانه تشخیصی آنالیتیکال کیت Senmurv EBV-PCR در حضور IC کاهش نمی‌یابد.

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 محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

اطلاعات پاتوژن

ویروس اپشتین بار (EBV) یکی از اعضای خانواده Herpesviridae است. این ویروس یک DNA دو رشته ای ۱۷۲ کیلو جفت بازی دارد که هم به صورت خطی در ویریون بالغ و هم به شکل دایره ای و اپیزومی در سلول های آلوده به صورت پنهان وجود دارد. EBV در درجه اول سلول های لنفوئیدی از دودمان B را آلوده می کند. EBV عامل اتیولوژیک مونونوکلئوز عفونی است. تقریباً همه افراد در طول زندگی در دوره ای به این ویروس مبتلا می شوند. عفونت های دوران کودکی عمدتاً بدون علامت هستند. EBV با برخی سرطان ها از جمله لنفوم Burkitt's و کارسینوم نازوفارنکس (NPC) مرتبط است. این ویروس همچنین به طور فزاینده ای به عنوان یک عامل ویروسی مهم در گیرندگان پیوند شناخته می شود.

محتویات کیت

Title	24 Tests
	Volume per Vial
Master- EBV	360 µl/tube × 1
PTC- EBV	100 µl/tube × 1
Internal control	300 µl/tube × 1

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. بیش از دو مرتبه منجمد و ذوب کردن کیت به هیچ وجه توصیه نمی گردد زیرا می تواند باعث کاهش در حساسیت کیت گردد. نگهداری کیت در دمای۴ درجه سانتی گراد هیچ گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.

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

۱. کیت استخراج DNA ویروسی
۲. سمپلر قابل تنظیم و نوك سمپلر فیلتردار DNAse & RNase free
۳. سانتریفوژ رومیزي
٤. بلوك خنك كننده
٥. وایتکس ۱۰ درصد
٦. گان و دستکش
۷. لوله های ۰٫۲ میکرولیتر
۸. دستگاه Rotor-Gene با کانال‌های فلوروسنت مخصوص Cycling Green و Cycling Yellow و یا Cycling A.FAM و Cycling A.HEX
۹. نرم افزار Rotor-Gene Q نسخه ۱٫۷٫۹٤ نرم افزار Rotor-Gene ٦۰۰۰ نسخه ۱٫۷٫٦٥, ۱٫۷٫۸۷, ۱٫۷٫۹٤ و نرم افزار Rotor-Gene ۳۰۰۰ نسخه ٦٫۰٫۲۳ و یا بالاتر.
۱۰. استریپ و کپ ml ۰٫۱ برای استفاده در روتور ۷۲ چاهکی یا لوله‌های PCR 0.2 ml برای روتورهای ۳٦ چاهکی

نکات احتیاط عمومی

۱. نگهداری و تخلیص نمونه های گرفته شده از مریض، کنترل ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده سازی MasterMix صورت پذیرد.
۲. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
۳. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد 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.
٤. تمام مراحل مربوط به تهیه MasterMix باید بر روی یخ یا جعبه های سرد(Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به Master- EBV بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.

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.

۲. پیشنهاد می شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد ازکار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین طور بعد از کارلامپ UV زده شود.

۳. پیشنهاد می شود محل آماده سازی مخلوط واکنش، از فضای 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 درتاریکی نگهداری نمایید .

کنترل ها

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 بجای نمونه در یک واکنش استفاده گردد.

نمونه گیری و نگهداری

۱. به منظور تشخیص ویروسEBV 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 نامناسب ، استخراج DNA غیر استاندارد، انتقال نامناسب نمونه و یا از غلظت کم نمونه ناشی گردد.

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

---

[1] Good Laboratoty Practice

[2] Personal Protective Equipment

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 پایینتر نگهداری شوند.
۷. نمونه های که ٤ روز یا بیشتر در دمای ٤-۲ درجه سانتیگراد نگهداری شده اند یا در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پایین تر فریز نشده است قابل استفاده برای آزمایش نمی باشد.

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 هر ۱ میکرولیتر از حجم حل کردن نهایی ژنوم ویروس اضافه کنید. برای مثال اگر ژنوم تخلیص شده را در ۵۰ میکرولیتر آب حل میکنیم باید درهنگام تخلیص پلاسمای مربوط به آن به پلاسما ۱۰میکرولیترکنترل 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 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 بافرلیز 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 درطی مرحله PCR اضافه کرد که در این حال هیچ گونه کنترلی بر روی مرحله تخلیص وجود نخواهد داشت. در این حالت ۱ میکرولیترکنترل داخلی به ۱۵میکرولیتر Master-EBV اضافه شده و سپس از این مخلوط مقدار ۱۵ میکرولیتر با ۱۰ میکرولیتر از نمونه تخلیص شده مخلوط می گردد.

آماده سازی

آماده سازی با دو روش صورت میگیرد:

۱. در صورتیکه کنترل داخلی را در مرحله استخراج و طی مراحل آماده سازی اضافه کرده اید، مقدار 15 μl از Master Mix به ازای هر واکنش داخل تیوب ریل تایم بریزید.

۲. اگر از IC تنها به منظور چک مرحله PCR استفاده می کنید، اما نه به عنوان یک کنترل برای روش استخراج ، Master Mix را مطابق جدول شماره ۲ تهیه نمایید:
در این حالت ابتدا ۱ میکرولیتر از کنترل داخلی به Master- EBV اضافه می شود و سپس از این مخلوط ۱۵ میکرولیتر برای هر واکنش استفاده میگردد.

Number of Reactions (rxns)	Volume
Master- EBV	15 µl
Internal Control	1 µl
Final Volume	15 µl

جدول ۲: مقادیر مورد نیاز برای هر واکنش

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 از آب استفاده میشود. تیوب NTC 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 کنترل مثبت و ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید (جدول شماره ۳). سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

Reaction Setup	Volume
Master Mix	15 µl
Sample or Control	10 µl
Total Volume	25 µl

جدول ۳ : مقادیر مورد نیاز برای آماده سازی واکنش

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 EBV) و هم در کانال زرد (مربوط به سیگنال دریافتی از کنترل داخلی) انجام شود.

مقادیر دمایی هر قسمت در جدول ٤ آورده شده است.

علاوه بر تعریف دمایی، دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم گردد.

	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 ℃	4 min	1
Denaturation	95 ℃	15 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green and Yellow	58 ℃	60 sec	

آنالیز نتایج

آنالیز اطلاعات

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

۱- سیگنال فلورسانس در کانال (A.FAM=green) کاملا مشخص است:
نتیجه تست مثبت است و نمونه تخلیص شده از پلاسما حاوی ویروس EBV می باشد. در این حالت، وجود سیگنال فلورسانس در کانال Yellow اهمیت ندارد، زیرا در صورت بالا بودن غلظت اولیه ژنوم ویروس سیگنال در کانال Yellow 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 کانالYellow مربوط به کنترل داخلی قابل مشاهده است. این حالت نشان دهنده عدم وجود ویروس در نمونه پلاسما میباشد. همچنین مثبت بودن سیگنال حاصل از کانال Yellow وجود هر گونه مهار کننده واکنشPCR را منتفی میکند.

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

ارزیابی آنالیتیکال

اختصاصیت آنالیتیکال

اختصاصیت کیت Senmurv EBV-PCR در وهله اول با انتخاب پرایمرها و پروب ها و همچنین انتخاب شرایط واکنش دقیق مورد تایید قرار می‌گیرد. با استفاده از آنالیز مقایسه‌ای توالی‌ها، پرایمرها و پروب‌ها از منظر هومولوژی‌های احتمالی با تمامی توالی‌های ثبت شده در بانک‌های ژنی بررسی شدند. قابلیت تشخیصی (Detectability) تمامی ژنوتیپ‌های مرتبط از طریق همترازسازی توالی‌ها و همینطور توسط واکنش PCR بر روی دستگاه‌های Rotor-Gene بر روی ژنوتیپ‌های زیر مورد تایید قرار گرفت.

Control group	EBV (Cycling Green or Cycling A.FAM)	Internal control (Cycling Yellow or Cycling A.HEX)
Human herpesvirus 1 (herpes simplex virus 1)	-	+
Human herpesvirus 2 (herpes simplex virus 2)	-	+
Human herpesvirus 3 (varicella-zoster virus)	-	+
Human herpesvirus 5 (cytomegalovirus)	-	+
Human T cell leukemia virus 1	-	+
Human T cell leukemia virus 2	-	+

بعلاوه، اختصاصیت کیت از طریق ۱۰۰ نمونه مختلف پلاسمایی EBV منفی تایید شد. این نمونه‌ها هیچ سیگنالی از طریق پرایمرها و پروب‌های مستر میکس کیت ایجاد نکردند.

واکنش‌دهی متقابل (cross-reactivity) کیت SENMURV Senmurv EBV-PCR با استفاده از گروه‌های کنترل مورد بررسی قرار گرفت. هیچ یک از پاتوژن‌های تست شده واکنش‌دهی (reactivity) نشان ندادند. هیچ گونه واکنش‌دهی متقابل در عفونت های مختلط ظاهر نشد.

حساسیت آنالیتیکال (پایین ترین حد تشخیص)

محدوده تشخیص آنالیتیکال و همچنین محدوده تشخیص آنالیتیکال با در نظرگرفتن روش استخراج (محدودیت‌های تشخیصی) برای کیت Senmurv EBV-PCR مورد ارزیابی قرارگرفت. محدوده تشخیص آنالیتیکال با استفاده از نمونه‌های بالینی مثبت برای EBV در کنار یک روش استخراج خاص تعیین میشود. در مقابل، محدوده تشخیص آنالیتیکال بدون استفاده از نمونه بالینی و مستقل از روش استخراج مورد نظر و با استفاده از استانداردهایی با غلظت‌های معلوم تعیین می‌گردد.

برای تعیین حساسیت آنالیتیکال کیت Senmurv EBV-PCR، یک سری رقت ویروس EBV از ۵۰ IU/µl تا ۰٫۰۵ IU/µl ایجاد گردید و با استفاده از کیت Senmurv EBV-PCR و با دستگاه Rotor-Gene موردارزیابی قرارگرفت. این آزمایش در سه روز و هر روز در ۲۰ تکرار صورت پذیرفت و نتایج از طریق آنالیز تعیین شدند. محدوده تشخیص آنالیتیکال کیت به همراه دستگاه Rotor-Gene، 0.45 IU/ µl برآورد شد (pvalue≤0.05). این بدین معناست که پارتیکل ویروسی با رقت 0.45 IU/µl به احتمال ۹۵٪ قابل تشخیص هستند.

حساسیت آنالیتیکال با استفاده از کیت استخراج QIAamp® DSP Virus Kit بر روی نمونه های بالینی و همچنین سری رقت استاندارد بین‌المللی DNA ویروسEBV بررسی گردید. با استفاده از کیت QIAamp DSP Virus Kit با حجم استخراج ۰٫۵ میلی لیتر و با حجم elution ۶۰ میکرولیتر DNA این نمونه‌ها استخراج گردید. هر یک از ۷ رقت در ۳ روز مختلف و در ۲۰ تکرار با استفاده از کیت Senmurv EBV-PCR مورد بررسی قرارگرفت و نتایج آنالیز شدند. محدوده تشخیصی آنالیتیکال با در نظرگرفتن استخراج کیت توسط دستگاه Rotor-Gene 6000 100 IU/ml است (pvalue≤0.05). این بدان معناست که ۹۵٪ احتمال دارد که 100 IU/ml مشاهده شود.

دقت

داده‌ی دقت کیت تعیین واریانس کل آزمایش را ممکن می‌سازد. واریانس کلی شامل تنوع درون-آزمایشی (تنوع در نتایج متعدد نمونه‌ها با غلظت یکسان و دریک آزمایش)، تنوع بین-آزمایشی (تنوع در نتایج متعدد

حاصل آزمایش‌های مشتق از دستگاه‌های متفاوت و یا دستگاه یکسان اما توسط اوپراتورهای مختلف آزمایشگاه)، و تنوع بین-بچ (inter-batch) تنوع در نتایج متعدد حاصل از استفاده ازbatchهای مختلف است. داده‌های بدست آمده براي تعیین انحراف استاندارد، واریانس و ضریب تغییرات PCRهای مختص پاتوژن و همینطور کنترل داخلی بکار گرفته شدند.

داده‌ی دقت کیت با استفاده از استانداردهای معلوم العیار مشخص گردید. این آزمایش در ۲۰ روز هر روز ۲ ران انجام شد و داده دقت بر اساس لگاریتم مقادیر به دست آمده تعیین شد. دقت کیت در مقدار IU/ml 300 حدود ۹۵٪ می باشد.

ارزیابی کلینیکال

حساسیت و اختصاصیت کلینیکال

در قیاس با نتایج مستخرج از کیت Altona EBV RT-PCR به عنوان روش مرجع، حساسیت تشخیصی و اختصاصیت تشخیصی کیت SENMURV Senmurv EBV-PCRبه ترتیب ۹۸٪ و 100% برای تمامی نمونه‌ها بدست آمد.

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	Temperature Limitation	
مطالعه دستورالعمل	Consult Instruction for Use	
تعداد تست	Content sufficient for <n> test	
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 ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی : 1997775555

پشتیبان فنی: 09301821601

تلفن های تماس: 02122082120