دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

HHV8

با روش

Real-Time PCR

Doc. #: IFU-HHV8-01Doc. Version: 00 Revision Date: 03-11-2024

فهرست مطالب

شماره رفرانس 3
شرح کیت 3
اصول 3
دامنه کاربرد 3
محتویات کیت 4
نگهداری و انتقال کیت 4
نکات احتیاط عمومی 5
هشدارها و محدودیت‌ها 6
نمونه گیری و نگهداری 6
عوامل تداخلی 7
برنامه ریزی دمایی 8
تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها 9
دستگاه Rotor-Gene 9
دستگاه **MIC** 10
آنالیز نتایج 11
***در صورت مثبت بودن **Positive control** و منفی بودن کنترل داخلی کیفیت نمونه و استخراج را بررسی کنید 11
نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف 11
دستگاه Rotor-Gene 11
دستگاه **MIC PCR** 12
ارزیابی آنالیتیکال 13
حساسیت آنالیتیکال 13
اختصاصیت آنالیتیکال 13
ارزیابی کلینیکال 13
حساسیت و اختصاصیت کلینیکال 13
پشتیبانی فنی 14
اطلاعات تماس 14

شماره رفرانس

- BONHHV8-24

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورتReal-Time ساخته شده است. پنل تشخیص HHV8 سین‌مورو شامل یک لوله با قابلیت شناسایی پاتوژن است این لوله حاوی کنترل داخلی است که امکان بررسی صحت انجام تست را در مراحل PCR میسر می سازد. نتایج تشخیصی به‌دست‌آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم ویروس میباشد. 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 بازکردن مجدد لوله های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

دامنه کاربرد

Human Herpes Virus 8 Real Time Detection PCR Kit برای شناسایی و تمایز ویژه ویروس هرپس انسانی 8 در نمونه های بالینی بیماران با علائم و نشانه های ویروس هرپس انسانی 8. این آزمایش به عنوان کمکی در تشخیص HHV-8 در ترکیب با عوامل خطر بالینی و اپیدمیولوژیک در نظر گرفته شده است.

اطلاعات پاتوژن

ویروس هرپس انسانی 8 (HHV-8) که به آن ویروس هرپس سارکوم کاپوزی (KSHV) نیز می‌گویند، متعلق به خانواده ویروس‌های DNA Herpeseviridae است. این بیماری باعث ایجاد سارکوم کاپوزی (یک بدخیمی عروقی) و بیماری های لنفوپرولیفراتیو سلول B مانند لنفوم افیوژن اولیه (PEL) و بیماری کاستلمن چند مرکزی (MCD) می شود. احتمال بدخیمی های مرتبط با HHV-8 در میان افراد مبتلا به HIV به طور قابل توجهی بیشتر است. این فعالیت ارزیابی و درمان هرپس ویروس انسانی -8 را بررسی می‌کند و در ارزیابی و درمان بیماران مبتلا به این بیماری برجسته می‌کند.

محتویات کیت

Title	24 Tests Volume per Vial
MasterMix-HHV8	360 µl/tube × 1
Internal Control	300 µl/tube × 1
Positive Control	100 µl/tube × 1

جدول 1: محتویات کیت

نگهداری و انتقال کیت

1- 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.
2- نگهداریکیت دردمای۴ درجه سانتیگراد هیچگاه نباید بیشتر از یکساعت شود.
3- این کیت نیاز به حمل برروی بسته‌های یخزده (Frozen Ice Pack) را دارد.
4- همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
5- از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و درنتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
6- از قراردادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
7- معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (15 تا 25 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؛

1. کیت استخراج DNA
2. سمپلر قابل تنظیم دراندازه های مختلف و نوك سمپلر فیلتردار
3. سانتریفوژ رومیزي
4. بلوك خنك كننده
5. وایتکس10 درصد
6. گان و دستکش
7. دستگاه Rotor-Gene , MIC, Azur

8. نرم افزار Rotor-Gene Q نسخه 1.7.94 ، نرم افزار Rotor-Gene 6000 نسخه 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94 و نرم افزار Rotor-Gene 3000 نسخه 6.0.23 و یا بالاتر.
9. استریپ و کپ 0.1 ml برای استفاده در روتور 72 چاهکی

نکات احتیاط عمومی

1. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و درحین 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.
2. استفاده از سرسمپلرهای فیلتردار وRNase & DNase free
3. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای HHV8 نمونه های گرفته شده از مریض، کنترلها و محصولات حاصل از PCR باید درمحلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده سازی MasterMix صورت پذیرد.
4. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
5. 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 طورکامل توصیه میشود.
6. تمام مراحل مربوط به تهیه MasterMix 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.
7. هنگام کار با موادشیمیائي، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهي، دستکش یکبارمصرف، و عینکهاي محافظ داشته باشید.
8. 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.
9. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
10. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها تعویض شوند.
11. از تیپ های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتر دار برای جلوگیری از ورود آلودگی DNA استفاده کنید.
12. لطفاً لوله‌های PCR را با نایلون یکبارمصرف بسته‌بندی کرده و به‌درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR پس از امپلیفای را باز نکنید.
13. همه مواد یکبار مصرف، یکبار مصرف هستند، مجدداً استفاده نکنید.
14. مواد موجود درکیتکه بلا استفاده هستند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به‌درستی دور انداخته شوند.
15. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اتانول 75٪ و وایتکس 10٪ اسپری کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

1. 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 2-BSL انجام شود.استفاده از دستورالعمل :
Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Of Specimen
2. پیشنهاد می شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس 10 درصد تمیز شود و همین طور بعد از کار لامپ UV زده شود .
3. پیشنهاد می شود محل استخراج DNA ، 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 .
4. پس از آماده سازی مخلوط واکنش ، آن را در تاریکی نگهداری نمایید .

کنترل‌ها

1. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک حاصل از استخراج DNA استفاده شود.
2. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
3. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به‌جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نمونه گیری و نگهداری

-برای تشخیص عفونت HHV8 می‌توان از نمونه‌ی سرم، پلاسما، cell lysates یا نمونه‌ی سواب از قسمت فعال عفونت استفاده کرد.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

نمونه می‌تواند کمتر از 8 ساعت در یخچال با محدوده دما از 2 تا 8 درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی‌مدت آن، باید در دمای 20 – درجه سانتیگراد منجمد شده و نگهداری شود.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

کنترل داخلی (**Internal Control**)

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

---

[1] Good Laboratoty Practice

[2] Personal Protective Equipment

عوامل تداخلی

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

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسیدنوکلئیک باید توسط کیت‌های جداسازی موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود.

نمونه‌ها باید با کیسه یخ زیرصفر درجه سانتیگراد منتقل شده و استخراج شوند تا بلافاصله DNA به دست آید. اگر DNA استخراج شده بلافاصله مورداستفاده قرارنگیرد، باید دردمای 20- درجه سانتیگراد ذخیره شود.

کنترل داخلی

این کیت به همراه یک کنترل داخلی برای مصرف کننده نهایی تهیه شده است . این امر به کاربر 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 0.2 میکرولیتر به ازاء هر 1 میکرولیتر از حجم حل کردن نهایی ژنوم ویروس اضافه می شود. برای مثال اگر ژنوم تخلیص شده را در 50 میکرولیترآب حل میکنیم باید درهنگام تخلیص به نمونه 10میکرولیترکنترل داخلی اضافه کنیم . به بیان دیگر حجم کنترل اضافه شده تنها تابعی از میزان الوشن (Elution) نهایی می باشد. این کنترل داخلی را می توان به مخلوط بافر لیز و پلاسما اضافه نمود. این نکته قابل ذکراست 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 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 1 میکرولیترکنترل داخلی به 15میکرولیتر MasterMix-HHV8 اضافه شده و سپس از این مخلوط مقدار 15 میکرولیتر با 5 میکرولیتر از نمونه تخلیص شده مخلوط می گردد.

آماده سازی

آماده سازی با دو روش صورت میگیرد :

1. در صورتیکه کنترل داخلی (IC) را درمرحله استخراج و طی مراحل آماده سازی اضافه کرده اید، به ازای هر نمونه مقدار 15µl از MasterMix-HHV8 را برای هر تست در نظر بگیرید.
2. اگر IC را درمرحله استخراج اضافه نکردید و می خواهید در مرحله PCR به عنوان کنترل کننده مهار PCR استفاده کنید، Master Mix را مطابق توضیح تهیه نمایید:

ابتدا 1 میکرولیتر از کنترل داخلی را به MasterMix-HHV8 اضافه کنید و سپس از این مخلوط 15 میکرولیتر به ازای هر واکنش استفاده نمایید (جدول 2).

Number of Reactions (rxns)	Volume
MasterMix-HHV8	15µl
Internal Control	1 µl
Final Volume	15 µl

جدول 2: آماده سازی میکس با احتساب کنترل داخلی

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 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، 5 میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسیدنوکلئیک 5 میکرولیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید (جدول 3).

Reaction Setup	**Volume**
MasterMix-HHV8	15 µl
Sample or Control	5 µl
Total Volume	20 µl

جدول 3: الگوی اضافه کردن نمونه

برنامه ریزی دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های MIC و Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانالهای Green و Yellow نیز مناسب برای استفاده از این کیت هستند. پس از تنظیم کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول آورده شده است.

	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	4 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	40
Annealing and Acquisition on Channel Green, and Yellow	60°C	30 sec	

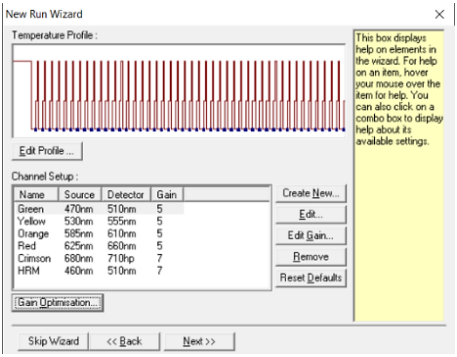
جدول 4: برنامه دمایی کیت HHV8

علاوه بر تعریف دمایی دستگاه که در قسمت بالا آمده است دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیمگردد. اندازه‌گیری تابش فلورسانس باید برای رنگ‌های FAM، HEX تنظیم شود.

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها

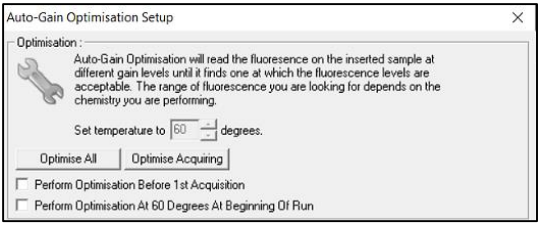
دستگاه Rotor-Gene

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل 1).



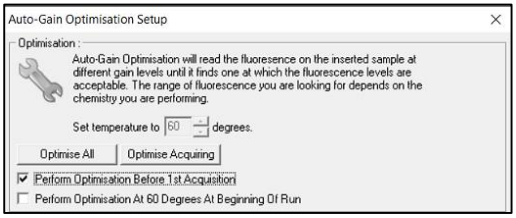
شکل 1. تنظیمات دستگاه

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای هر 2 کانال سبز، زرد ، بازه‌ی Target sample range از 5 تا 10 (حالت پیش‌فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل 2).



شکل2. تنظیمات دستگاه

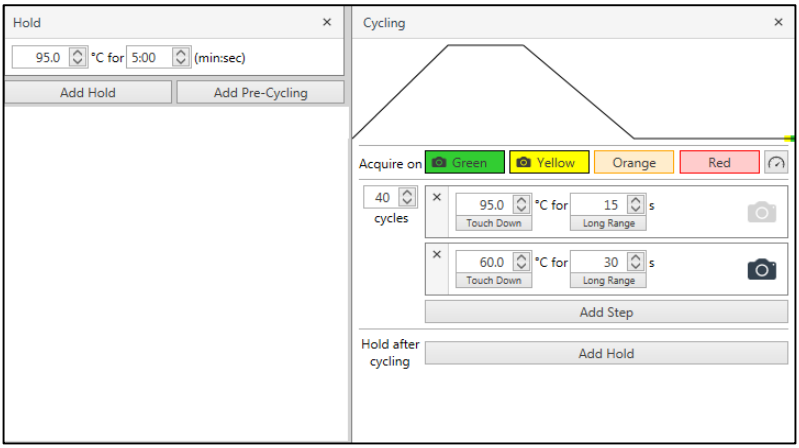
پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌یPerform Optimization Before 1st Acquisation را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل 3).



شکل3. تنظیمات دستگاه

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 2 کانال فعال کنید (شکل 4).



شکل4. تنظیمات دستگاه

آنالیز نتایج

1.آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در 2 کانال رنگی Green و Yellow و با انتخاب فلورفورهای FAM و HEX پس از قرار دادن درصد حذف داده‌های پرت بر 5%، آستانه را در بازه‌ی مناسب قرار دهید.

2. برای تفسیر نتایج، مطابق جدول صفحه بعد عمل نمایید.

	Green	Yellow
Master	**HHV8**	**IC**

جدول تفسیر نتایج

	Green	Yellow	Result
MasterMix-HHV8	+	+	**Posetive**
	+	-	**Posetive**
	-	+	**Negative**
	-	-	**Uninterpretable***

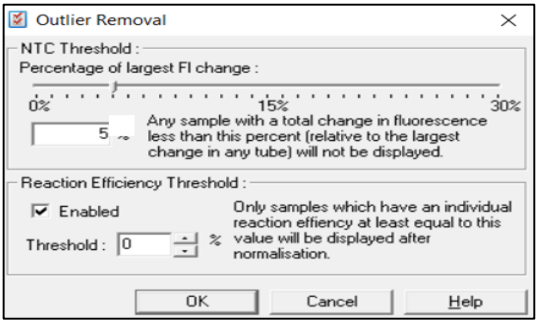
*در صورت مثبت بودن **Positive control** و منفی بودن کنترل داخلی کیفیت نمونه و استخراج را بررسی کنید .

نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف

دستگاه Rotor-Gene

آنالیز اطلاعات در دستگاه Corbett 6000,3000و Rotor-gene Q باید توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

1. از منوی Quantitation، Analysis را انتخاب کرده و روی یک رنگ، به طور مثالGreen، دوبار کلیک کنید.
2. با کلیک بر گزینه ی Outlier Removal، ترشلد افیشنسی واکنش را به شکل زیر فعال کنید (شکل 5).
3. آستانه (Threshold) را در کانال‌های Green، Yellow بر روی بازه ی مناسب (0.02) و بالاتر از فلورسانس نمونه ی منفی قرار دهید.

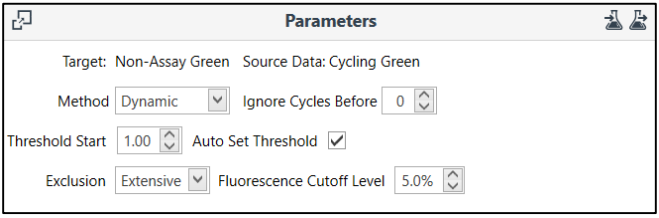


شکل 5. تنظیمات دستگاه

دستگاه MIC PCR

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

1. از منوی Analysis انتخاب کرده و روی یک رنگ، به طور مثال Non-Assay Green، کلیک کنید.
2. انتخاب Threshold را به صورت اتوماتیک با فعال کردن گزینه‌ی Auto Set Threshold انجام دهید(شکل 6).



شکل 6. تنظیمات دستگاه

3. مراحل بالا را برای کانال‌های Yellow تکرار کنید.

ارزیابی آنالیتیکال

حساسیت آنالیتیکال

باتوجه به نتایج حاصله، حدپایین تشخیصی برای این کیت در به شرح زیر است:

Target	LOD
HHV8	5 copies per PCR
IC	10 copies per PCR

اختصاصیت آنالیتیکال

به جهت بررسی اختصاصیت پرایمرها و پروب‌های محصول برای HHV8 احتمال شناسایی غیراختصاصی دیگر عوامل عفونی مربوطه مورد بررسی قرارگرفته است. همچنین انتخاب شرایط واکنش دقیق مورد تأیید نیز تضمین شده است. این کیت با DNA عوامل زیر واکنش متقاطع ندارد.

Bacterium	Streptococcus hemolytis-β	Enterococcus faecalis
	Clostridium sporogenes	syphilis
	Escherichia coli	Bacillus pumilus
	Serratia marcescens subsp marcescens	
	Salmonella enterica subsp enterica	Pseudomonas aeruginosa
	Staphylococcus aureus subsp.aureus	Micrococcus luteus
Virus	herpes simplex virus 6-7	Human papilloma virus
Fungus	Candida albicans	monilia albican

ارزیابی کلینیکال

حساسیت و اختصاصیت کلینیکال

برای تعیین حساسیت و اختصاصیت کلینیکال از 100 نمونه مثبت و 100 نمونه منفی استفاده شد که نتایج در جدول زیر نشان‌داده‌شده است:

Target	Sensitivity	Specificity
HHV8	95%	100%

پشتیبانی فنی

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

نشانه‌ها

	InVitro Diagnostic Medical Device	برای مصرف آزمایشگاهی
	Catalog Number	کد کالا
	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،خیابان استاد محمدعلی کشاورز (24 متری)، کوچه 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