



دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

VZV

با روش

**Real-Time PCR**

**STEM  
CELL  
TECHNOLOGY**  
شرکت فناوری بن یاخته

Doc. #: IFU-VZV-01Doc. Version: 00 Revision Date: 04-24-2024

3	شماره فرانس
3	شرح کیت
3	اصول
3	دامنه کاربرد
4	محتویات کیت
4	نگهداری و انتقال کیت
5	نکات احتیاط عمومی
6	هشدارها و محدودیت‌ها
6	نمونه‌گیری و نگهداری
7	عوامل تداخلی
8	برنامه ریزی دمایی
9	تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها
9	دستگاه Rotor-Gene
10	دستگاه MIC
10	آنالیز نتایج
11	نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف
11	دستگاه Rotor-Gene
12	دستگاه MIC PCR
13	ارزیابی آنالیتیکال
13	حساسیت آنالیتیکال
13	اختصاصیت آنالیتیکال
13	ارزیابی کلینیکال
13	حساسیت و اختصاصیت کلینیکال
14	پشتیبانی فنی
14	اطلاعات تماس

- BONVZV-24

## شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به صورت Real-Time ساخته شده است. پل تشخیص VZV 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 می‌سازد. نتایج تشخیصی به‌دست‌آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

## اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم ویروس میباید. 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 کمی‌سازی محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به بازکردن مجدد لوله‌های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

## دامنه کاربرد

Varicella-Zoster Virus Real Time Detection PCR Kit برای شناسایی و تمایز ویژه ویروس واریسلا زوستر در نمونه‌های بالینی بیماران با علائم و نشانه‌های مرتبط می‌باشد. این آزمایش به عنوان کمکی در تشخیص VZV در ترکیب با عوامل خطر بالینی و اپیدمیولوژیک در نظر گرفته شده است.

## اطلاعات پاتوژن

ویروس واریسلا زوستر (VZV) عضوی از خانواده Herpesviridae است و همراه با ویروس هرپس سیمپلکس 1 (HSV-1) و ویروس هرپس سیمپلکس 2 (HSV-2) به عنوان ویروس آلفا‌هرپس طبقه بندی می‌شود. VZV دارای ژنوم DNA دو رشته‌ای خطی است که تقریباً 125 کیلو باز دارد.

VZV از طریق استنشاق قطرات یا تماس مستقیم با ضایعات عفونی پخش می‌شود. بیش از 90 درصد بزرگسالان آنتی بادی برای VZV دارند. این ویروس دو تظاهرات بالینی مختلف ایجاد می‌کند: Varicella (آبله مرغان) و Zoster (زونا). واریسلا عفونت اولیه با VZV است و بسیار مسری است. واریسلا بیشتر در کودکان رخ می‌دهد. برخلاف عفونت‌های اولیه با سایر تبخال‌ها، که معمولاً بدون علامت هستند، واریسلا معمولاً از نظر بالینی آشکار است و با یک اگزانتهم تاولی عمومی که اغلب با تب همراه است مشخص می‌شود. زوستر (زونا) یک عفونت ثانویه به دلیل فعال شدن مجدد VZV نهفته در گانگلیون‌های حسی است. زوستر معمولاً در بزرگسالان یا بیماران دچار نقص ایمنی رخ می‌دهد و شامل یک فوران دردناک و محدود ضایعات تاولی همراه با التهاب ریشه خلفی مرتبط با گانگلیون‌های حسی عصب جمجمه است.

Title	24 Tests Volume per Vial
MasterMix-VZV	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- نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتیگراد هیچگاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
- 3- این کیت نیاز به حمل بر روی 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 در نتیجه 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 در اندازه های مختلف و نوک سمپلر فیلتردار
3. سانتریفوژ رومیزی
4. بلوک خنک کننده
5. وایتکس 10 درصد
6. گان و دستکش
7. دستگاه Rotor-Gene , MIC

8. نرم افزار Rotor-Gene Q نسخه 1.7.94 ، نرم افزار Rotor-Gene 6000 نسخه 1.7.65 ،  
 1.7.94 ، 1.7.87 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 سرسمپله‌های فیلتردار و RNase & DNase free
3. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای VZV نمونه‌های گرفته شده از مریض، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR باید درمحل کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده سازی MasterMix صورت پذیرد.
4. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.
5. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد (به ویژه استانداردهای کیت) را به خوبی پیمتاژ نمایید و به طور مختصراً اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طور کامل 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 مواد شیمیائی، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یکبار مصرف، و عینکهای 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 کاملاً 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 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 استفاده کنید.
12. لطفاً لوله‌های PCR را با نایلون یکبار مصرف بسته‌بندی کرده و به‌درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR پس از امپلیفای را باز نکنید.
13. همه مواد یکبار مصرف هستند، مجدداً استفاده نکنید.
14. مواد موجود در کیت که بلا استفاده هستند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به‌درستی دور انداخته شوند.
15. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیمت‌ها و تجهیزات را با اتانول 75٪ و وایتکس 10٪ اسپری کنید.

## هشدارها و محدودیت‌ها

1. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP<sup>1</sup> توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)<sup>2</sup> 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 Of Specimen
2. پیشنهاد می‌شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس 10 درصد تمیز شود و همین‌طور بعد از کار لامپ UV زده شود.
3. پیشنهاد می‌شود محل استخراج DNA، آماده‌سازی 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 آماده‌سازی 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 به جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

## نمونه گیری و نگهداری

- برای تشخیص عفونت VZV می‌توان از نمونه‌ی مایع مغزی-نخاعی (CSF)، پلاسما، 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.

---

<sup>1</sup> Good Laboratory Practice

<sup>2</sup> Personal Protective Equipment

## عوامل تداخلی

حضور (0.5M) EDTA، (1N) HCl، دانه‌های سیلیس (1 $\mu$ l)، خون (1 $\mu$ l)، 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 اسید نوکلئیک 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 مورد استفاده قرار نگیرد، باید در دمای 20- درجه سانتیگراد ذخیره شود.

## کنترل داخلی

این کیت به همراه یک کنترل داخلی برای مصرف‌کننده 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 می‌شود. برای مثال اگر ژنوم تخلیص شده را در 50 میکرولیتر آب حل می‌کنیم باید در هنگام تخلیص به نمونه 10 میکرولیتر کنترل داخلی اضافه کنیم. 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 پلازما اضافه نمود. این نکته قابل ذکر است که اضافه کردن کنترل داخلی به مخلوط بافر لیز و پلازما 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 میکرولیتر کنترل داخلی به 15 میکرولیتر MasterMix-VZV اضافه شده و سپس از این مخلوط مقدار 15 میکرولیتر با 5 میکرولیتر از نمونه تخلیص شده مخلوط می‌گردد.

## آماده سازی

آماده سازی با دو روش صورت می‌گیرد:

1. در صورتیکه کنترل داخلی (IC) در مرحله استخراج و طی مراحل آماده سازی اضافه کرده آید، به ازای هر نمونه مقدار 15 $\mu$ l از MasterMix-VZV را برای هر تست در نظر بگیرید.
2. اگر IC در مرحله استخراج اضافه نکردید و می‌خواهید 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-VZV اضافه کنید و سپس از این مخلوط 15 میکرولیتر به ازای هر واکنش استفاده نمایید (جدول 2).

Number of Reactions (rxns)	Volume
MasterMix-VZV	15 µl
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 (NTC) No Template Control باید گذاشته شود. بر اساس جدول فوق در NTC به جای نمونه استخراج شده 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، 5 میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسیدنوکلیک 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-VZV	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	



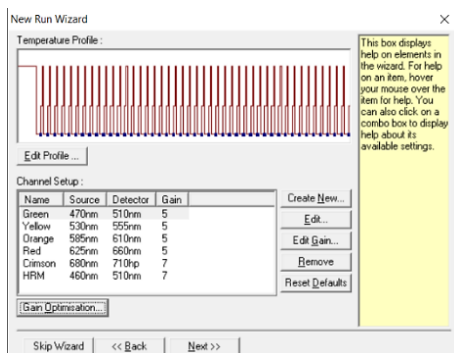
#### جدول 4: برنامه دمایی کیت VZV

علاوه بر تعریف دمایی دستگاه که در قسمت بالا آمده است دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم گردد. اندازه گیری تابش فلورسانس باید برای رنگ های FAM، HEX تنظیم شود.

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها

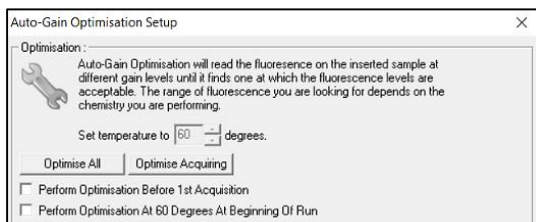
#### دستگاه Rotor-Gene

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



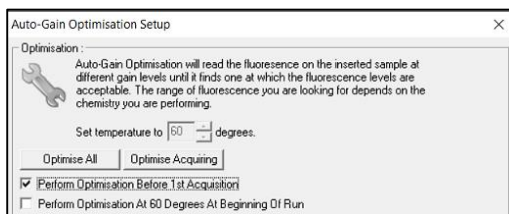
شکل 1. تنظیمات دستگاه

در این صفحه با انتخاب گزینه ی Optimise Acquiring برای هر 2 کانال سبز، زرد، بازه ی Target sample range از 5 تا 10 (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل 2).



شکل 2. تنظیمات دستگاه

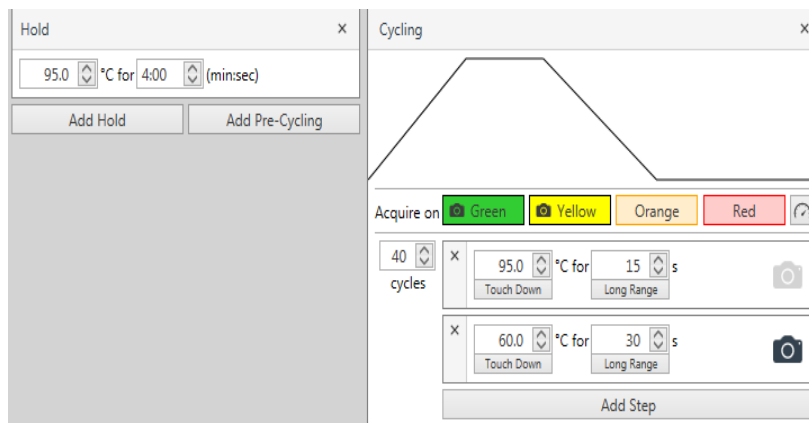
پس از انتخاب بازه ی مناسب برای هر کانال، گزینه ی Perform Optimization Before 1st Acquisition را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل 3).



شکل 3. 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).



شکل 4. 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.

Master	Green	Yellow
	VZV	IC

	Green	Yellow	Result
MasterMix-VZV	+	+	Positive
	+	-	Positive
	-	+	Negative
	-	-	Uninterpretable*

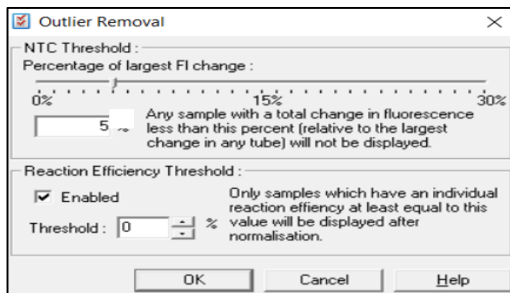
\*در صورت مثبت بودن Positive control و منفی بودن کنترل داخلی کیفیت نمونه و استخراج را بررسی کنید.

نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف

دستگاه Rotor-Gene

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

1. از منوی Analysis, Quantitation را انتخاب کرده و روی یک رنگ، به طور مثال Green، 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.

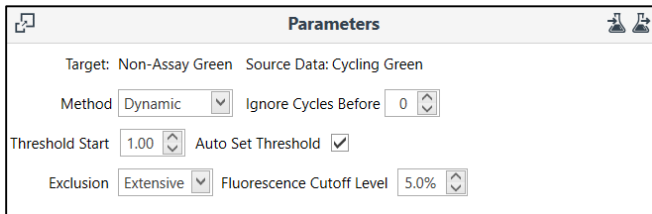


شکل 5. تنظیمات دستگاه

## دستگاه MIC PCR

آنالیز اطلاعات در دستگاه Magnetic Induction Cycler (Mic) PCR توسط نرم افزار 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 کانال های Yellow تکرار کنید.

ارزیابی آنالیتیکال

حساسیت آنالیتیکال

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

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

اختصاصیت آنالیتیکال

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









Bacterium	Streptococcus hemolytis- $\beta$	Enterococcus faecalis
	Clostridium sporogenes	syphilis
	Escherichia coli	Bacillus pumilus
	Serratia marcescens subsp marcescens	Pseudomonas aeruginosa
	Salmonella enterica subsp enterica	Micrococcus luteus
Virus	Staphylococcus aureus subsp.aureus	
	herpes simplex virus1-2- 6-7-8	Human papilloma virus
	BK Virus	Hepatit B
Fungus	Hepatit C	HIV
	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 نشان داده شده است:

Target	Sensitivity	Specificity
VZV	95%	100%

	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 sufficient 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](http://www.Senmurv.co) Email: [info@senmurv.ir](mailto:info@senmurv.ir)