GeneovA

Always one step Ahead

راهنمای کیت تشخیص مولکولی ویروس‌های گوارشی

نام محصول: GA Gastro5G OneStep RT-PCR Kit

کد محصول: GA-5GAS.50 | IVD

معرفی

نوروویروس، ساپوویروس، آستروویروس، روتاویروس و آدنوویروس از اصلی ترین ویروس‌های عامل بیماری‌های گوارشی در گروه‌های سنی مختلف جوامع انسانی به شمار می‌روند که از طریق مدفوعی-دهانی منتقل می‌شوند.[1]

نوروویروس و ساپوویروس حاوی ژنوم بصورت RNA تک رشته سنس مثبت و بدون پوشش از خانواده کالیسی ویریده هستند. از بین ۷ گروه ژنی نوروویروس‌ها تنها گروه GI وGII آلوده‌کننده انسان هستند و از ۵ گروه ساپوویروس‌ها تنها گروه GIII بیماریزای انسان نیست. آستروویروس‌ها نیز حاوی ژنوم RNA تک رشته سنس مثبت و بدون پوشش از خانواده آستروویریده هستند که تیپ های ۱ تا ۸ آن قادر به آلوده کردن انسان می‌باشند.[2]

روتاویروس‌ها از جمله مهمترین ویروس‌های عامل بیماری‌های گوارشی در سراسر جهان هستند. ژنوم روتاویروس‌ها حاوی RNA دو رشته‌ای قطعه قطعه است که عضو خانواده رئوویریده می‌باشند. در حال حاضر ۹ گونه از این جنس وجود دارد که شامل A, B, C, D, E, F, G, H, I می‌باشد و شایعترین نوع روتاویروس در انسان نوع A است که عامل بیش از ۹۰٪ عفونت‌های روتاویروسی در انسان است. آدنوویروس نیز ویروسی DNA دار دو رشته خطی بدون پوشش است که در خانواده آدنوویریده قرار دارد. دو تیپ ۴۰ و ۴۱ آدنوویروس از عوامل مهم گاستروانتریت در انسان می‌باشد.[3]

کیت GA Gastro5G OneStep RT-PCR قادر به تشخیص کیفی ویروس‌های نامبرده به طور همزمان به روش Taq Man Real Time PCR در یک مرحله می‌باشد. از داده‌های این کیت میتوان به عنوان یک عامل کمک کننده در تشخیص استفاده کرد.

اساس تست

مخلوط پرایمر و پروب این کیت به صورت Senary بوده که شش ناحیه حفاظت شده از پنج خانواده ویروس‌های گوارشی نوروویروس، ساپوویروس، آستروویروس، روتاویروس و آدنوویروس را شناسایی می‌کند. این نواحی پس از شناسایی توسط مخلوط واکنش موجود در کیت، تکثیر شده و آزادسازی سیگنال فلورسانس توسط دستگاه Real Time PCR مورد سنجش قرار می‌گیرد. کنترل داخلی در این کیت شامل یک طراحی پرایمر و پروب برای ژن RNase P به صورت اندوژن می‌باشد که علاوه بر بررسی مراحل نمونه برداری و استخراج الگو، کیفیت قابل قبول RNA استخراج شده را مشخص کرده تا مانع از نتایج منفی کاذب شود.

محتویات کیت

این کیت حاوی موارد مورد نیاز آزمایش به فرمت ۵۰ تستی بوده که به شرح زیر می‌باشد:

ردیف	محلول	مقادیر	تعداد
۱	GA Gastro5G Mastermix	۱۷۵ میکرولیتر در هر ویال	۲ ویال ۲۵ تستی
۲	GA Gastro5G Positive Control	۱۰۰ میکرولیتر در هر ویال	۱ ویال
۳	GA Gastro5G Negative Control	۱۰۰ میکرولیتر در هر ویال	۱ ویال

شرایط نگهداری

۱. دمای نگهداری این کیت ۲۰±۵°C- می‌باشد.
۲. از فریز و دفریز شدن محلول‌های موجود در کیت تا حد امکان خودداری کنید.
۳. مدت زمان استفاده از محتویات این کیت تا ۱ سال بعد از زمان تولید می‌باشد، تاریخ انقضاء بر روی کیت درج شده است.

دستگاه های هماهنگ با کیت

این کیت قابلیت انجام در تمامی دستگاه‌های Real Time PCR دارای کانال‌های TEXAS RED ,FAM ,HEX و CY5 (نارنجی، سبز، زرد و قرمز) را دارد.

مشخصات نمونه

۱. نمونه مورد استفاده در این کیت به منظور شناسایی ویروس‌های گوارشی نوروویروس، ساپوویروس، آستروویروس، روتاویروس و آدنوویروس مدفوع می‌باشد.
۲. شرایط نمونه گیری: جمع آوری نمونه براساس پروتکل استاندارد مطابق با نوع نمونه انجام شود.
۳. نگهداری و انتقال نمونه: نمونه‌های جمع آوری شده بلافاصله برای انجام آزمایش قابل استفاده هستند. درصورت تاخیر در انجام سریع تست، نگهداری نمونه‌ها به مدت حداکثر ۴۸ ساعت در دمای ۴°C توصیه می‌شود. برای ذخیره طولانی مدت نمونه‌ها، بهتر است نمونه‌ها را بلافاصله پس از جمع آوری، در دمای فریزر ۲۰- یا ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری کرد.[4]

آماده سازی الگو پیش از آزمایش

الگوی مورد نیاز برای انجام این تست، RNA و DNA ویروسی بوده که طبق پروتکل استاندارد کیت‌های معتبر استخراج مانند QIAamp MinElute Virus Spin Kit و سایر کیت‌های استخراج ژنوم ویروسی معتبر عمل می کند. RNA و DNA استخراج شده به صورت مستقیم قابل استفاده برای انجام آزمایش می‌باشد و در غیر این صورت RNA و DNA استخراج شده را در دمای ۷۰°C- نگهداری کنید. همچنین از فریز و دفریز کردن مکرر نمونه RNA و DNA تا حد امکان خودداری نمایید.

آماده سازی مخلوط واکنش

تقسیم مخلوط واکنش:

محتویات کیت را از جعبه آن خارج کنید و اجازه دهید تا به دمای اتاق رسیده و به صورت کامل مایع شوند. پس از رسیدن محلول‌ها به دمای اتاق، ابتدا چند ثانیه تیوب‌ها را اسپین کنید و سپس طبق موارد زیر عمل کرده و هر تیوب واکنش را آماده نمایید:

۱. ابتدا به هر کدام از تیوب‌های واکنش ۷ میکرولیتر از مخلوط واکنش GA Gastro5G MasterMix (حاوی مواد مورد نیاز واکنش و پرایمر و پروب) و ۷ میکرولیتر آب تمیز عاری از نوکلئاز را اضافه کنید.

اضافه کردن الگو به مخلوط واکنش

۲. پس از آماده سازی مخلوط واکنش، مخلوط‌های حاصل را به منطقه تمیز انجام آزمایش منتقل کنید:

- تیوب‌های نمونه‌های مجهول: به هر کدام از تیوب‌های واکنش مورد سنجش، ۷ میکرولیتر الگو اضافه کنید.
- تیوب کنترل منفی: به هر کدام از تیوب‌های واکنش کنترل منفی، ۷ میکرولیتر از کنترل منفی اضافه کنید.

۳. سپس درب تیوب‌های آماده شده در مرحله ۲ را بسته و اسپین کنید (در صورت استفاده از دستگاه‌های Real Time PCR دارای روتور چرخان نیازی به اسپین کردن تیوب‌ها نمی باشد).

- تیوب کنترل مثبت: در یک فضای دیگر و دور از محوطه آماده سازی سایر مخلوط‌های واکنش به تیوب واکنش کنترل مثبت، مقدار ۷ میکرولیتر از مخلوط کنترل مثبت موجود در کیت اضافه کنید.

مواد مورد نیاز برای هر تست	میزان مورد نیاز برای هر تست
مخلوط واکنش GA Gastro5G Mastermix	۷میکرولیتر
آب تمیزعاری از نوکلئاز	۷میکرولیتر
الگو (RNA یا DNA، کنترل منفی یا کنترل مثبت)	۷میکرولیتر
حجم نهایی واکنش	۲۱میکرولیتر

- قابل ذکر است می‌توان در زمان استخراج الگو درآخرین مرحله استخراج، با دو برابرکردن حجم Elution بافر (از ۵۰ میکرولیتر به ۱۰۰ میکرولیتر) از میزان مهارکنندگی الگو کاسته تا واکنش با کیفیت بهتری انجام شود.

انجام واکنش RealTime PCR

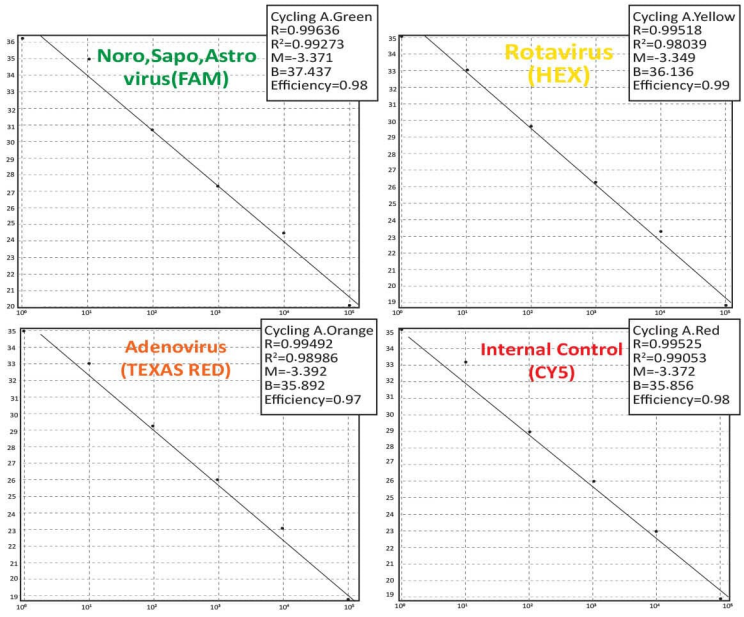
۱. نام گذاری نمونه‌ها:
تیوب‌ها را داخل دستگاه Real Time PCR قرار داده و بعد از آن هر کدام از تیوب‌ها (نمونه های مجهول، کنترل مثبت و کنترل منفی) را نام‌گذاری کنید.

۲. انتخاب کانال سنجش:
کانال سبز یا FAM را برای تشخیص ویروس‌های نوروویروس، ساپوویروس و آستروویروس، کانال زرد یا HEX برای تشخیص روتاویروس، کانال نارنجی یا TEXAS RED برای تشخیص آدنوویروس و کانال قرمز یا CY5 برای تشخیص RNase P به عنوان کنترل داخلی را در دستگاه Real Time PCR انتخاب کنید.

۳. برنامه دمایی و زمانی واکنش مورد نظر مطابق با شرایط جدول زیر می باشد:

برنامه دمایی و زمانی استاندارد کیت GA Gastro5G OneStep RT-PCR				
ترتیب واکنش	مرحله		دما	زمان	تعداد سیکل
۱	Holding		۵۳°C	۱۵دقیقه	۱
۲	Holding		۹۵°C	۳ دقیقه	۱
۳	cycling	Denaturation	۹۴°C	۵ ثانیه	۴۶ سیکل
		Annealing, Extension and fluorescence measurement	۶۰°C	۳۰ ثانیه	

پس از ایجاد برنامه و تنظیمات جدید، فایل مورد نظر را ذخیره و شروع انجام واکنش را راه اندازی کنید.



نمودار استاندارد پرایمر و پروب های کیت GA Gastro5G One Step RT- PCR در کانال‌های سبز، زرد، نارنجی و قرمز

کمترین حد تشخیص (LOD) ویروس‌های گوارشی نورویروس، ساپوویروس، آستروویروس، روتاویروس و آدنویروس برابر با ۵۰۰ کپی می باشد که دارای حساسیت بالای ۹۸ درصد در تکرار ۲۰ تایی با حجم واکنش ۲۱ میکرولیتر است. رنج دینامیک و رنج خطی کیت موجود برابر با 10^1 تا 10^{10} می باشد. عرض از مبدا واکنش (میزان Cq قابل قبول در کمترین کپی) در سیکل ۴۰ بوده و ضریب همبستگی واکنش (r^2) یا میزان تطابق با منحنی استاندارد در حدود ۰,۹۹ درصد می باشد. همچنین بازده واکنش در ۴ ژن برابر با ۹۶ تا ۹۹ درصد است.

خطرات و پیشگیری

۱. لطفا پیش از استفاده راهنمای کیت را با دقت مطالعه کنید. پرسنل آزمایشگاه باید آموزش دیده و آشنایی کامل با خطرات دستگاه‌ها را داشته باشند. تمام وسایل و امکانات باید پیش از استفاده استریل بوده و جابه‌جایی بین بخش‌های مختلف PCR در آن دیده نشود. در هر بخش باید وسایل و مواد مختص به خود را داشته باشد. به همراه این کیت، لوازم نمونه گیری، نگهداری نمونه و استخراج ژنوم وجود ندارد و در زمان انجام تست توصیه می‌شود از تیپ‌های فیلتردار استفاده شود.

۲. این کیت تنها قابلیت استفاده در شرایط آزمایشگاهی را دارد و کاربرد دیگری برای آن تعریف نشده است. همچنین توصیه میشود کنترل کیفیت داخلی توسط هر آزمایشگاه صورت گیرد.

۳. مدیریت آزمایشگاه طبق دستورالعمل‌های آزمایشگاه‌های مولکولی انجام گیرد. تمام نمونه‌ها باید به صورت بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند و باید در یک فضا یا هود با کلاس ایمنی زیستی سطح II مورد پردازش قرار گیرد. پرسنل تمامی تمهیدات لازم مانند تجهیزات حفاظت شخصی(PPE) که شامل استفاده از دستکش‌های یکبار مصرف، عینک، گان یا روپوش آزمایشگاهی می‌شود را رعایت کند. به همراه این کیت لوازم محافظتی شخصی مورد نیاز وجود ندارد و لازم است قبل از استفاده تهیه شود.

۴. پرسنل در طی انجام مراحل استخراج یا آماده‌سازی مخلوط واکنش، دستکش‌های خود را بین هر مرحله باید مرتب تعویض کند تا از ایجاد آلودگی‌های کاذب کننده در روند آزمایش جلوگیری کند. مراحل کار باید طبق شرایط استاندارد آزمایشگاه در پیشگیری از ایجاد آلودگی و عفونت انجام گیرد. همچنین شرایط دفع زباله‌های عفونی این تست به مانند دیگرعوامل بیماری‌زا می‌باشد.

۵. شرایط نگهداری این کیت به مدت ۷ روز در دمای یخچال یا در پک‌های یخی می‌باشد که برای نگهداری طولانی مدت و حفظ نیمه عمر محصول آن را در دمای ۲۰-°C قرار دهید.

1. Oude Munnink, B.B.; Van der Hoek, L. Viruses Causing Gastroenteritis: The Known, The New and Those Beyond. Viruses 2016, 8, 42. https://doi.org/10.3390/v8020042

2. Gillian A M Tarr, et al. Clinical Profiles of Childhood Astrovirus-, Sapovirus-, and Norovirus-Associated Acute Gastroenteritis in Pediatric Emergency Departments in Alberta, 2014–2018, The Journal of Infectious Diseases, Volume 225, Issue 4, 15 February 2022, Pages 723–732, https://doi.org/10.1093/infdis/jiab429

3. Celik, C., et al. Rotavirus and adenovirus gastroenteritis: time series analysis. 2015. Pediatrics International Journal, 57: 590– 596. doi: 10.1111/ped.12592.

4. Gary N. McAuliffe et al. Systematic application of multiplex PCR enhances the detection of bacteria, parasites, and viruses in stool samples. The Journal of Infection, Volume 67, Issue 2, 2013, https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.04.009.

mabnaGene مبنا ژن پارس
مشاوره، راه اندازی، تجهیز و تامین کلیه اقلام بخش مولکولی

تهران، اشرفی اصفهانی، جنب درمانگاه بهراد، ساختمان شماره ۵۴، طبقه دوم واحد ۴، تلفکس : ۹-۴۴۰۰۰۱۵۸

Do not use after the year, month and date mentioned
Upper limit of temperature
Read instructions before use
IVD in vitro diagnostic
Manufacturer
Keep away fron sunlight
REF Catalogue number
Sufficient for
Do not re-use
Temperature limit
LOT Batch code
Manufactuing code

تحلیل نتایج

پس از انجام و خاتمه واکنش، نتایج ذخیره شده را مطابق با جدول زیر آنالیز کنید:

مراحل	حالت مورد نظر	رد یا قبول بودن واکنش
مرحله اول بررسی کنترل منفی	بدون گراف تکثیر یا سینگال سیگموئیدی با میزان فلورسنس غیر قابل قبول در هر کدام از کانال‌ها	قبول - عدم آلودگی مخلوط واکنش
	داشتن سیگنال سیگموئیدی و Cq بالاتر از ۴۰ در هر کدام از کانال‌ها	قبول با یک شرط - در این حالت تنها نمونه‌های بیماران دارای Cq با فاصله حداقلی ۶ سیکل از آلودگی در کانال مربوطه را می‌توان به عنوان نمونه‌های دارای ژنوم ویروس مورد قبول دانست.
	داشتن سیگنال سیگموئیدی و Cq بالاتر از ۳۵ در هر کدام از کانال‌ها	قبول با شرط - در این حالت تنها نمونه‌های دارای Cq با فاصله حداقلی ۶ سیکل از آلودگی در کانال مربوطه را می‌توان به عنوان نمونه های دارای ژنوم ویروس مورد قبول دانست.
مرحله دوم بررسی کنترل مثبت	دارای سیگنال سیگموئیدی و Cq کمتر از ۳۵ در هر کدام از کانال‌ها	قبول - عملکرد صحیح پرایمر و پروب، مخلوط واکنش و عدم تخریب کنترل مثبت یا دیگر اعضاء واکنش که نشان از نگهداری صحیح آن دارد.
	دارای سیگنال سیگموئیدی اما Cq بالاتر از ۳۵ در هر کدام از کانال‌ها	رد واکنش - تخریب کنترل مثبت یا یکی دیگر از اعضاء واکنش که نشان از عدم نگهداری صحیح آن دارد. در صورت مثبت بودن نمونه های تحت بررسی می‌توانید از این عیب صرف نظر کنید.
مرحله سوم بررسی نمونه مجهول	۱. تنها کانال FAM دارای سیگنال سیگموئیدی و Cq کمتر از ۴۰ می‌باشد	قبول واکنش و نتیجه وجود یکی از ویروس‌های **نورویروس، ساپوویروس** و **آستروویروس** یا عفونت همزمان در نمونه مثبت می‌باشد.
	۲. تنها کانال HEX دارای سیگنال سیگموئیدی و Cq کمتر از ۴۰ می‌باشد.	قبول واکنش و نتیجه وجود **روتاویروس** در نمونه مثبت می‌باشد.
	۳. تنها کانال Texas Red دارای سیگنال سیگموئیدی و Cq کمتر از ۴۰ می‌باشد.	قبول واکنش و نتیجه وجود **آدنوویروس** در نمونه مثبت می‌باشد.
	۴. تنها کانال CY5 دارای سیگنال سیگموئیدی و Cq کمتر از۳۵ می‌باشد.	قبول واکنش - استخراج الگو، انجام واکنش سنتز cDNA در الگو RNA به درستی انجام گرفته است و واکنش از نظر وجود ویروس‌های گوارشی **نورویروس، ساپوویروس، آستروویروس، روتاویروس** و **آدنوویروس** منفی می‌باشد.

حد آستانه مثبت

با توجه به مطالعه مقدار مرجع، Cq مرجع برای ژن های مورد نظر تا مقدار ۴۰ با داشتن شرایط ذکر شده قابل قبول است.

محدودیت های روش تشخیص

۱. زمان نمونه‌گیری و انجام نمونه‌گیری نامناسب، انتقال نادرست، پردازش نامناسب نمونه، شرایط بد نگهداری کیت، عدم انجام صحیح واکنش توسط کاربر می‌تواند باعث ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.

۲. آلودگی نمونه به بعضی مواد یا داروهای خاص و یا آلودگی در حین پردازش نمونه می‌تواند باعث ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.

۳. امکان ایجاد جهش و تغییرات توالی هدف در ویروس‌های نورویروس، ساپوویروس، آستروویروس، روتاویروس و آدنوویروس می‌تواند یکی از دلایل ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.

۴. آزمایش باید طبق پروتکل سازنده کیت و در شرایط Good Laboratory Practice انجام شود.

عملکرد و ارزیابی محصول

پرایمر و پروب‌های این کیت براساس توالی ژنی اختصاصی ویروس‌های گوارشی نورویروس، ساپوویروس، آستروویروس، روتاویروس و آدنوویروس طراحی شده است. همچنین طراحی انجام شده هیچ واکنش متقاطعی با دیگر توالی‌های ژنومی انسانی، ویروسی و باکتریایی در تست in silico از خود نشان نداده است.

جدول نمونه ارزیابی بالینی کیت GA Gastro5G OneStep RT-PCR

نوع نمونه	نتیجه با کیت تجاری کمپانی X تشخیص ویروس‌های گوارشی به روش OneStep RT-PCR	نتیجه با کیت GA Gastro5G OneStep RT-PCR
نمونه منفی از نظر ویروس‌های گوارشی نورویروس، ساپوویروس، آستروویروس، روتاویروس و آدنوویروس	۱۰۰ نمونه منفی	۱۰۰ نمونه منفی
نمونه مثبت از نظر ویروس‌های گوارشی نورویروس، ساپوویروس، آستروویروس، روتاویروس و آدنوویروس	۵۰ نمونه مثبت	۵۰ نمونه مثبت