

راهنمای کیت مولکولی نسل جدید تشخیص HIV, HBV, HCV

نام محصول : GA HIV/HBV/HCV OneStep RT-PCR

IVD

کد محصول: GA-3HIBC.50

معرفی

HBV (Hepatitis B Virus) از خانواده هپادناویریده، با ژنوم DNA حلقوی دو رشته ناقص، ویروس HIV (Human Immunodeficiency Virus) از خانواده رتروویریده، جنس لنتی ویروس و ویروس HCV (Hepatitis C Virus) از خانواده فلاوی ویریده جنس هپاسی ویروس که دارای ژنوم تک رشته سنس مثبت RNA می باشند، از جمله مهمترین ویروس های منتقل شونده از طریق خون می باشند که سالانه باعث مرگ و میر افراد زیادی در جهان می شوند.^۱

این کیت GA HIV/HBV/HCV OneStep RT-PCR قادر است به صورت کیفی هر سه ویروس نامبرده را به طور همزمان به روش TaqMan Real Time PCR در یک مرحله شناسایی و افتراق دهد تا هم در سرعت، راحتی انجام تست و کاهش هزینه های تشخیص مثر ثمر باشد. از داده های این کیت می توان به عنوان یک عامل کمک کننده در تشخیص استفاده کرد.

اساس تست

مخلوط پرایمر و پروب این کیت به صورت Quintuple target gene بوده که پنج ناحیه حفاظت شده ژنوتایپ های یک تا هفت HCV، ژنوتایپ های A تا H از HBV و گروه های M، N و O از HIV-1 را شناسایی کرده که در صورت شناسایی توسط مخلوط واکنش موجود در کیت این نواحی تکثیر شده و آزادسازی سیگنال فلورسانس ایجاد شده توسط دستگاه Real Time PCR سنجش می شود.

کنترل داخلی در این کیت شامل یک طراحی پرایمر و پروب اختصاصی برای RNA ژن RNase P به صورت اندوژن می باشد که علاوه بر بررسی مراحل نمونه برداری و استخراج الگو، کیفیت قابل قبول RNA و DNA 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 می باشد:

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

شرایط نگهداری

- دمای نگهداری این کیت $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ می باشد.
- از فریز و دفریز شدن محلول های موجود در کیت تا حد امکان خودداری کنید.
- مدت زمان استفاده از محتویات این کیت تا ۱ سال بعد از زمان تولید می باشد، تاریخ انقضاء کیت بر روی کیت درج شده است.

دستگاه های هماهنگ با کیت

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

مشخصات نمونه

- نمونه مورد استفاده در این کیت به منظور شناسایی ویروس های HIV, HBV و HCV به طور معمول پلاسما EDTA دار می باشد.
- شرایط نمونه گیری: جمع آوری نمونه بر اساس پروتکل استاندارد مطابق با نوع نمونه انجام شود.
- نگهداری و انتقال نمونه: نمونه های جمع آوری شده بلافاصله برای انجام آزمایش قابل استفاده هستند که باید در زمان ارسال به آزمایشگاه در محفظه بسته و در مجاورت یخ انتقال انجام شود. همچنین نگهداری نمونه در دمای 4°C برای ۲ روز، دمای 20°C برای ۳ ماه و دمای 70°C برای مدت طولانی تری قابل انجام است. تا حد امکان از فریز و دفریز کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.^۲

آماده سازی الگو پیش از آزمایش

الگوی مورد نیاز برای انجام این تست RNA و DNA ویروسی بوده که می توان طبق

پروتکل استاندارد کیت های معتبر استخراج ژنوم ویروسی مانند Qiagen QIAamp DSP و Viral High Pure Viral Nucleic Acid Roche و دیگر کیت های استخراج ژنوم ویروسی معتبر عمل کرد. الگو استخراج شده بصورت مستقیم قابل استفاده برای انجام آزمایش می باشد و در غیر این صورت الگو استخراج شده را در دمای 70°C نگهداری کنید. همچنین تا حد امکان از فریز و دفریز کردن مکرر نمونه خودداری کنید.

آماده سازی مخلوط واکنش

محتویات کیت را از داخل جعبه آن خارج کنید و اجازه دهید تا به دمای اتاق رسیده و کامل بصورت مایع در آیند. پس از رسیدن محلول ها به دمای اتاق، چند ثانیه ویال ها را اسپین کنید و سپس طبق موارد زیر عمل کرده و هر تیوب واکنش را آماده کنید:

- ابتدا به هر کدام از تیوب های واکنش ۷ میکرولیتر از مخلوط واکنش GA IBC Mastermix (حاوی مواد مورد نیاز واکنش و پرایمر و پروب) و ۷ میکرولیتر آب تمیزکاری از نوکلئاز را اضافه کنید.

اضافه کردن الگو به مخلوط واکنش

- پس از آماده سازی مخلوط واکنش، مخلوط های حاصل را به منطقه تمیز انجام آزمایش منتقل کنید.

★ **تیوب های نمونه های مجهول:** به هر کدام از تیوب های واکنش مورد سنجش، ۷ میکرولیتر الگو اضافه کنید.

★ **تیوب کنترل منفی:** به هر کدام از تیوب های واکنش کنترل منفی، ۷ میکرولیتر از کنترل منفی اضافه کنید.

- سپس درب تیوب های موارد ۲ را بسته و اسپین کنید (در صورت استفاده از دستگاه های Rael Time PCR دارای روتور چرخان نیازی به اسپین کردن تیوب ها نمی باشد).

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

میزان مورد نیاز برای هر تست	مواد مورد نیاز برای هر تست
۷ میکرولیتر	مخلوط واکنش GA IBC Mastermix (FAM, HEX, TEXAS RED, CY5)
۷ میکرولیتر	آب تمیزکاری از نوکلئاز
۷ میکرولیتر	الگو (RNA/DNA. کنترل منفی یا کنترل مثبت)
۲۱ میکرولیتر	حجم نهایی واکنش

- ★ قابل ذکر است می توان در زمان استخراج الگو در آخرین مرحله استخراج، با دو برابر کردن حجم Elution بافر (از ۵۰ میکرولیتر به ۱۰۰ میکرولیتر) از میزان مهار کنندگی الگو کاسته تا واکنش با کیفیت بهتری انجام شود.

انجام واکنش RealTime PCR

- نام گذاری نمونه ها:

تیوب ها را داخل دستگاه Real Time PCR قرار داده و بعد از آن هر کدام از تیوب ها (نمونه های مجهول، کنترل مثبت و کنترل منفی) را نام گذاری کنید.

- انتخاب کانال سنجش:

کانال سبز یا FAM را برای تشخیص HBV، کانال زرد یا HEX برای تشخیص HIV، کانال نارنجی یا TEXAS RED برای تشخیص ژن RNase P به عنوان کنترل داخلی و کانال قرمز یا CY5 برای تشخیص ویروس HCV را در دستگاه Real Time PCR انتخاب کنید.

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

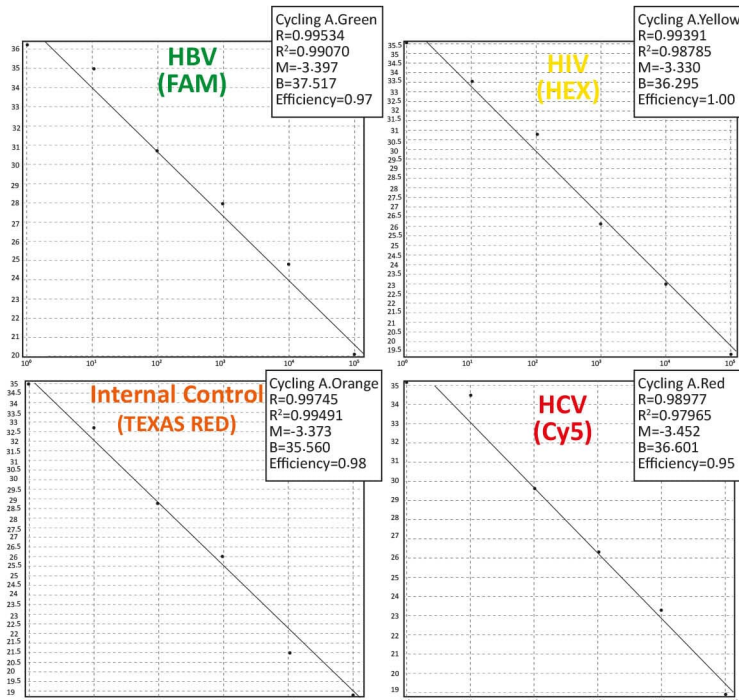
برنامه دمایی و زمانی استاندارد کیت GA HIV/HBV/HCV One Step RT-PCR				
ترتیب واکنش	مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
۱	Holding	53°C	۱۵ دقیقه	۱
۲	Holding	95°C	۳ دقیقه	۱
۳	cycling	94°C	۵ ثانیه	۴۶ سیکل
		60°C	۳۰ ثانیه	

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

مشخصات نمونه

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
قبول	بدون گراف تکثیر یا سیگنال سیگموتیدی با میزان فلورسنس غیر قابل قبول در هر کدام از کانال‌ها	قبول - عدم آلودگی مخلوط واکنش
	داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq بالاتر از ۴۰ در هر کدام از کانال‌ها	قبول با یک شرط - در این حالت تنها نمونه‌های بیمارار 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 سیگموتیدی 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 نمونه‌های دارای ژنوم ویروس مورد قبول می‌باشند.
رد	دارای سیگنال سیگموتیدی 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 سیگموتیدی 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.
	تنها کانال FAM دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰ می‌باشد.	قبول واکنش و نتیجه وجود HBV در نمونه مثبت می‌باشد.
رد	تنها کانال HEX دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰ می‌باشد.	قبول واکنش و نتیجه وجود HIV در نمونه مثبت می‌باشد.
	تنها کانال Texas Red دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۳۵ می‌باشد.	قبول واکنش - استخراج الگو، انجام واکنش سنتز cDNA در الگو RNA به درستی انجام گرفته است و واکنش از نظر وجود ویروس های HBV, HIV و HCV منفی می‌باشد.
	تنها کانال قرمز یا CY5 دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰ می‌باشد.	قبول واکنش و نتیجه وجود HCV در نمونه مثبت می‌باشد.
رد	تنها کانال‌های سبز یا کانال زرد، یا کانال سبز یا کانال قرمز و حتی هر سه کانال سبز و زرد و قرمز دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰ می‌باشد.	قبول واکنش و وجود عفونت مضاعف و همزمان ویروس‌های HIV و HBV یا HCV و یا هر سه ویروس مثبت می‌باشد.



منحنی استاندارد ویروس‌های HIV, HBV, HCV در کانال‌های سبز، زرد، قرمز

کمترین حد تشخیص (LOD) ویروس‌های HIV, HBV و HCV برابر با ۵۰۰ کپی می‌باشد 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 ۱۰^۱ تا ۱۰^{۱۰} می‌باشد. عرض از مبدا واکنش (میزان Cq قابل قبول در کمترین کپی) در سیکل ۴۰ بوده و ضریب همبستگی واکنش (R²) یا میزان تطابق با منحنی استاندارد در حدود ۰,۹۹ درصد می‌باشد. همچنین بازده واکنش در ۴ زن برابر با ۹۵ تا ۱۰۰ 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 روند و خطرات دستگاه‌ها را داشته باشند. تمام وسایل و امکانات باید پیش از استفاده استریل بوده و این وسایل جابه‌جایی بین بخش‌های مختلف PCR در آن دیده نشود. در واقع هر بخش باید تمام وسایل و امکانات باید پیش از استفاده استریل بوده و این وسایل جابه‌جایی بین بخش‌های مختلف PCR در آن دیده نشود. در واقع 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 کنترل کیفی برای هر آزمایش انجام شود.

۳. مدیریت آزمایشگاه طبق دستورالعمل‌های آزمایشگاه‌های مولکولی انجام گیرد. تمام نمونه ها باید به صورت بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند و باید در یک فضا یا هود با کلاس ایمنی زیستی سطح II نمونه 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 دیگر عوامل 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. Altavalah, H., Essa, S., Ezzikouri, S. et al. Hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus infections among people who inject drugs in Kuwait: A cross-sectional study. Sci Rep 9, 6292 (2019). [https://doi.org/10.1038/s41598-019-w](https://doi.org/10.1038/s41598-019-019-w)
2. Leoni MC, Ustianowski A, Farooq H, Arends JE. HIV, HCV and HBV: A Review of Parallels and Differences. Infect Dis Ther. 2018 Dec;7(4):407419-. doi: 10.1007/s401215-0210-018-. Epub 2018 Sep 4. PMID: 30182282; PMCID: PMC6249183.

mabnaGene
مینا 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: ۴۴۰۰۱۵۸-۹

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

حد آستانه مثبت

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

محدودیت های روش تشخیص

- زمان نمونه‌گیری و انجام نمونه‌گیری نامناسب، انتقال نادرست، پردازش نامناسب نمونه، شرایط بد نگهداری کیت، عدم صحیح انجام واکنش توسط کاربر می‌تواند باعث ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.
- آلودگی نمونه به بعضی مواد یا داروهای خاص و یا آلودگی در حین پردازش نمونه می‌تواند باعث ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.
- امکان ایجاد جهش و تغییرات توالی هدف در ویروس‌های HIV, HBV و HCV می‌تواند یکی از دلایل ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.
- آزمایش باید طبق پروتکل سازنده کیت و در شرایط Good Laboratory Practice باید انجام شود.

عملکرد و ارزیابی محصول

پرایمر و پروب‌های این کیت براساس توالی ژنی اختصاصی ویروس‌های HIV, HBV و HCV 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 OneStep RT- PCR GA HIV/HBV/HCV		
نوع نمونه	نتیجه با کیت تجاری کمپانی X تشخیص ویروس‌های HIV, HBV, HCV OneStep RT- PCR	نتیجه با کیت GA HIV/HBV/HCV OneStep RT- PCR
نمونه منفی از نظر ویروس‌های HIV, HBV, HCV	۱۰۰ نمونه منفی	۱۰۰ نمونه منفی
نمونه مثبت از نظر ویروس‌های HIV, HBV, HCV	۱۰۰ نمونه مثبت	۱۰۰ نمونه مثبت