

اساس آزمایش:

این کیت بر مبنای روش Real time PCR Multiplex با استفاده از پروب برای شناسایی B19 طراحی شده است. این روش مبتنی بر تکثیر قطعات DNA B19 طراحی شده است. تجزیه و تحلیل Real-time PCR برای حضور این عوامل در یک تیوب انجام می شود که در کانال فلورسنت زرد شناسایی می شود. قطعه ای از ژن انسانی (RNase P) در تیوب واکنش به عنوان کنترل داخلی استفاده می شود. بنابراین، استفاده از یک کنترل داخلی نه تنها نظارت بر مراحل آزمایش (استخراج DNA و تقویت Real-time PCR) بلکه ارزیابی کفایت نمونه برداری و ذخیره سازی مواد بالینی را ممکن می سازد.

محتویات کیت:

جدول ۱: معرف های کیت

معرف	برچسب	۲۴ تستی	۴۸ تستی	۹۶ تستی
مخلوط واکنش B19	MB19	۳۶۰ µl/Vial	۲ × ۳۶۰ µl/Vial	۴ × ۳۶۰ µl/Vial
کنترل منفی	Negative Control (NC)	۱۰۰ µl/Vial	۲ × ۱۰۰ µl/Vial	۴ × ۱۰۰ µl/Vial
کنترل مثبت	Positive Control (PC)	۱۰۰ µl/Vial	۲ × ۱۰۰ µl/Vial	۴ × ۱۰۰ µl/Vial

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست:

۱. انواع دستگاه های آزمایشگاهی شامل:
 ۱. یخچال و فریزر ۲۰- درجه آزمایشگاهی
 ۲. هود زیستی کلاس II یا PCR Work station
 ۳. سمپلرهای متغیر
 ۴. میکروسانتریفیوژ
 ۵. میکسر رومیزی
 ۶. دستگاه ارزیابی و کالیبر Real-time PCR با حداقل ۳ کانال HEX/VIC/JOE (زرد)، ROX/Texas ۶۷۰ Quasar/CY5 (قرمز) یا نارنجی (Red)

۲. موارد مصرفی شامل:

۱. کیت استخراج DNA ویروسی
۲. نوک سمپلر (استریل فیلتر دار ترجیح داده می شود)
۳. میکروتیوب عاری از RNase و DNase

۳. مواد مصرفی: دستکش یکبار مصرف فاقد پودر، روپوش های آزمایشگاهی، خودکار علامت گذاری آزمایشگاهی و رول دستمال کاغذی

عنوان محصول:

کیت شناسایی ویروس B19 در نمونه خون کامل به روش Real time PCR

معرفی محصول:

اریترو پاروویروس، که عموماً به عنوان ویروس B19 (B19V)، پاروویروس B19 یا گاهی اوقات اریتروویروس B19 نامیده می شود، اولین (و تا سال ۲۰۰۵ تنها) ویروس انسانی شناخته شده در خانواده Parvoviridae، جنس Erythroparvovirus است. پاروویروس B19 یک ویروس بسیار ریز است که از طریق ترشحات تنفسی مانند بزاق، خلط یا مخاط بینی، زمانی که فرد آلوده سرفه یا عطسه می کند، پخش می شود. پاروویروس B19 همچنین می تواند از طریق خون یا فرآورده های خونی پخش شود. یک زن باردار که به پاروویروس B19 آلوده است می تواند ویروس را به جنین خود منتقل کند. پاروویروس B19 ویروسی است که باعث یک بیماری رایج دوران کودکی می شود که به آن «بیماری پنجم» یا «اریتم عفونی» نیز می گویند. این ویروس در طول عفونت در قطرات تنفسی یافت می شود و به راحتی از طریق تماس فیزیکی نزدیک به دیگران منتقل می شود. پاروویروس همچنین می تواند از یک زن باردار به جنین او منتقل شود و از طریق قرار گرفتن در معرض خون و فرآورده های خونی منتقل شود. عفونت جنینی پاروویروس B19 اغلب از طریق آزمایش DNA ویروسی در نمونه های مادر و همچنین نمونه های نوزاد شناسایی می شود. روش PCR برای تشخیص DNA ویروسی استفاده می شود و روش بهینه برای تشخیص عفونت مزمن در بیماران دچار نقص ایمنی است زیرا سطح آنتی بادی متغیر است. اگر تست DNA پاروویروس B19 مثبت باشد، فرد در حال حاضر به پاروویروس B19 آلوده است. نتیجه منفی عفونت را رد نمی کند. ویروس ممکن است به اندازه کافی در نمونه وجود نداشته باشد تا شناسایی شود.

دستگاه های سازگار با کیت:

این کیت بر روی تمامی دستگاه های Real time PCR دارای کانال سبز (FAM)، ۶۷۰ Quasar/CY۵، (قرمز) یا Texas Red /ROX/ (نارنجی) قابل استفاده است.

نگهداری کیت:

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری شوند. حفظ دما در مدت زمان نگهداری محصول الزامی است.
۲. با افزایش دفعات ذوب کردن مجدد مواد، از حساسیت کیت کاسته می شود. برای کارایی هر چه بهتر کیت، از ذوب و یخ زدگی چندین باره محلول ها (بیش از ۳ مرتبه) خودداری شود.
۳. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج بروی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای مذکور پایدار هستند.
۴. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها بپرهیزید.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. نوع نمونه: خون کامل
۲. شرایط نمونه گیری: جمع آوری بر اساس شرایط و نوع نمونه طبق پروتکل های موجود انجام گیرد.
۳. نگهداری نمونه: نمونه دریافت شده می تواند بلافاصله برای آزمایش مورد استفاده قرار گیرد. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، می توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در ۲۰- سانتیگراد نگهداری شود.
۴. از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها اجتناب کنید. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، اما به طور کامل مخلوط شوند تا کاملاً یکنواخت و همگن گردند.

احتیاطات و هشدارها:

۱. کیت فقط برای تشخیص آزمایشگاهی کاربرد دارد. از نتایج این کیت به تنهایی جهت تشخیص تأیید یا رد عفونت نباید استفاده نمود.
۲. پیش از استفاده از کیت، ویال ها رو از لحاظ نشستی یا آسیب بررسی کنید.

۳. کیت را هنگام نگهداری و حین حمل و نقل به حالت ایستاده قرار دهید و از تماس تمام معرف ها با نور مستقیم جلوگیری شود.

۴. در طی انجام مراحل استخراج یا آماده سازی مخلوط واکنش، دستکش های خود را بین هر مرحله مرتب تعویض کنید تا از ایجاد آلودگی های کاذب در روند آزمایش جلوگیری شود. مراحل کار باید طبق شرایط استاندارد آزمایشگاه در پیشگیری از ایجاد آلودگی و عفونت انجام گیرد و همچنین شرایط دفع زباله های عفونی این تست به مانند دیگر عوامل بیماری زا می باشد.

۵. تمامی وسایل که در آزمایشگاه PCR مورد استفاده قرار می گیرند باید قبل و بعد از انجام تست با هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ و الکل ۷۰٪ ضد عفونی شوند و از جابه جایی این وسایل بین بخش های مختلف پرهیز کنید. در واقع هر بخش باید وسایل، مواد و مخصوصاً سمپلر مختص به خود را داشته باشد. در زمان انجام تست از نوک سمپلر فیلتر دار استفاده شود.

۶. کیت حاوی کنترل مثبت می باشد برای جلوگیری از ایجاد آلودگی به دیگر اجزای کیت، بهتر است آنرا از دیگر اجزای کیت جدا و در یک جعبه دیگر قرار دهید و در مواقع استفاده احتیاط کنید.

آماده سازی معرف ها:

نکات مهم در انجام تست:

۱. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.
۲. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.
۳. فرایند پیپتینگ از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. پیپتینگ ناکافی باعث تغییر غلظت مناسب مسترمیکس و پرایمر و پروب ها خواهد شد.
۴. در هر بار انجام آزمایش کنترل مثبت کیت باید استفاده شود تا کارائی واکنش مورد ارزیابی قرار گیرد.
۵. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، تیوب ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به تیوب از محیط خارج شوند.
۶. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی رنگ باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بروی آنها ممکن است منجر به نتایج کاذب شود.

روش انجام آزمایش:

آماده سازی قبل از واکنش Real-time PCR:

با استفاده از کیت های تخلیص ژنوم ویروس، نسبت به استخراج DNA ویروسی، از نمونه بالینی اقدام شود. لازم به ذکر است این محصول در بردارنده کیت استخراج DNA نیست ولی با بیشتر کیت های تخلیص اسید نوکلئیک مانند Roche همخوانی دارد.

آماده سازی مخلوط واکنش Real-time PCR

کیفی تک مرحله ای:

اسید نوکلئیک استخراج شده مستقیماً در واکنش q-PCR مورد استفاده قرار می گیرد. ابتدا در محل مناسب و استریل، محتویات کیت را از داخل بسته بندی خارج کرده و اجازه دهید تا در دمای اتاق ذوب شوند. مراحل مطابق با مراحل زیر انجام می شود:

۱- در کلیه آزمایشات برای هر بیمار یک میکروتیوب همراه با میکروتیوب های کنترل مثبت و منفی و NTC نام گذاری نمائید.

۲- جهت انجام آزمایش، مواد و واکنش-گر را روی یخ قرار دهید.

۳- ۱۵ میکرولیتر از BI۹ به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.

۴- ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل را به میکروتیوب NTC اضافه کنید.

۵- ۵ میکرولیتر کنترل منفی به میکروتیوب هایی که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.

۶- ۵ میکرولیتر از کنترل مثبت در یک فضای دور از محوطه آماده سازی سایر مخلوط های واکنش به تیوب واکنش کنترل مثبت اضافه کنید.

۷- ۵ میکرولیتر از DNA نمونه بیماران را به میکروتیوب هایی که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.

۸- محتویات میکروتیوب ها را خوب مخلوط کرده و یا Spin کوتاه انجام دهید.

جدول ۲: مقادیر واکنش

مواد مورد نیاز برای هر تست	میزان مورد نیاز برای هر تست
مخلوط واکنش BI۹	۱۵ میکرولیتر
انگو (کنترل منفی، DNA بیمار، کنترل مثبت)	۵ میکرولیتر
حجم نهایی واکنش	۲۰ میکرولیتر

انجام واکنش Real-time PCR:

تیوب های واکنش را در دستگاه Real time PCR قرار دهید و برنامه دمایی زیر را اجرا کنید. مشخصات تیوب های واکنش و نوع خوانش فلورسنت در هر تیوب را در جدول زیر مشاهده می کنید.

جدول ۳: مشخصات تیوب های واکنش و نوع خوانش تارگت های کیت

BI۹	تارگت ها
FAM	BI۹
ROX OR CY۵	کنترل داخلی

پس از انجام تنظیمات و انتخاب کانال خوانش، فایل را ذخیره کرده و دستگاه را با برنامه دمایی و زمانی زیر راه اندازی کنید.

جدول ۴: مشخصات واکنش حرارتی

تعداد سیکل	زمان	دما (C-)	مراحل
۱	۵ min	۹۵	Initial Denaturation
۴۰	۲۰ sec	۹۵	Annealing/ Extension
۴۰	۴۰ sec	۶۰*	(FAM/CY5orROX)

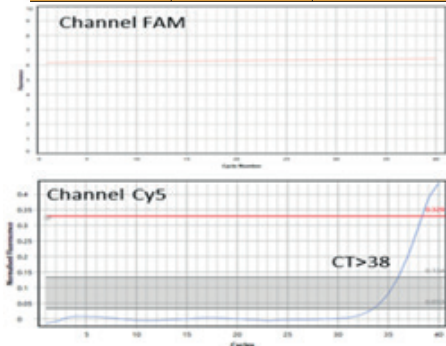
* مرحله ایی که خوانش انجام شود.

محاسبه نتایج:

پس از اتمام واکنش، نتایج ذخیره شده را مطابق با جداول زیر آنالیز کنید.

تصویر ۱: نتایج تفسیری تیوب واکنش در کیت

جواب	تفسیر	نتیجه
تکرار استخراج	BI۹	نامعتبر



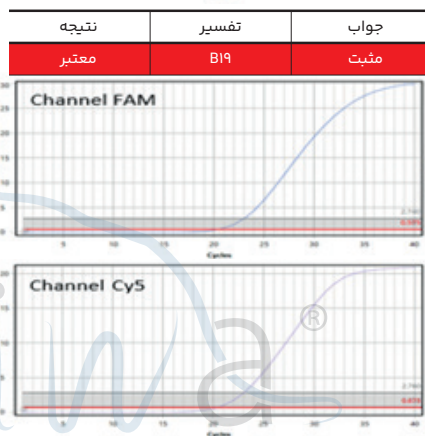
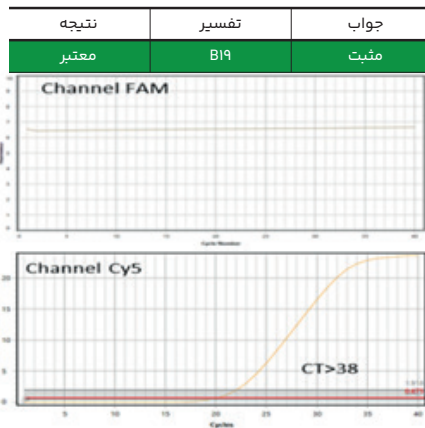
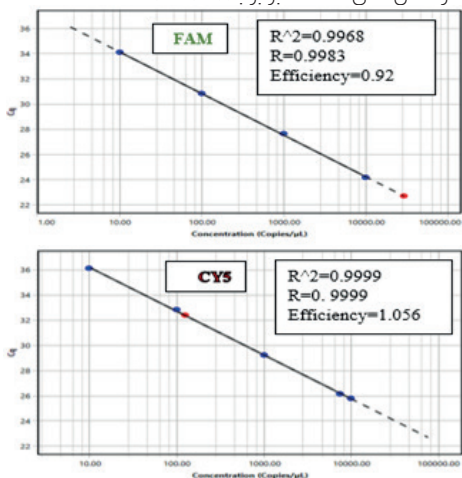
فازها	مورد انتظار و معتبر	نتیجه و تفسیر
BI9	حضور تکثیر سیگموتیدی در کانال FAM و منحنی تکثیر در کانال Cy5 در CT کمتر از ۳۵	مثبت
BI9	حضور تکثیر سیگموتیدی در کانال FAM و عدم منحنی تکثیر در کانال Cy5 در CT کمتر از ۳۵	مثبت
BI9	حضور تکثیر سیگموتیدی در تکرار استخراج و در صورت تکرار FAM و منحنی تکثیر در کانال Cy5 در CT بالاتر از ۳۵	تکرار همین نتیجه: مثبت
BI9	عدم تکثیر سیگموتیدی در تکرار استخراج و در صورت تکرار FAM و عدم منحنی تکثیر در کانال Cy5	همین نتیجه: تکرار نمونه‌گیری
BI9	عدم تکثیر سیگموتیدی در کانال FAM و منحنی تکثیر در کانال Cy5 در CT پائین تر از ۳۵	منفی
BI9	حضور تکثیر سیگموتیدی در کانال FAM و منحنی تکثیر در کانال Cy5 در CT پائین تر از ۳۵	مثبت

خصوصیات اجرایی کیت:

۱- حد پائینی اندازه‌گیری (Lower limit of measurement):
 حد آشکار سازی (Limit-of-detection):
 ساز (EPIV-A^۳ مؤسسه LOD) مطابق با راهنمای استاندارد های بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) بدست آمد. نهایتاً LOD کیت جهت شناسایی BI9 به روش Real-time PCR معادل ۳۹:CT می باشد.

۲- رنج دینامیک (Dynamic Range):

رنج دینامیک و رنج خطی کیت موجود برابر با ۱۰^{-۱} تا ۱۰^{-۹} می باشد. و ضریب همبستگی واکنش (r^۲) در حدود ۰/۹۹۹ می باشد. همچنین بازده (Efficiency) واکنش در کانال های مختلف برابر با ۹۸٪ تا ۹۹٪ است.



جدول ۵: تفسیر نتایج کیت

فازها	مورد انتظار و معتبر	نتیجه و تفسیر
کنترل منفی	عدم حضور منحنی تکثیر سیگموتیدی در کانال FAM یا CT کمتر از ۳۸ و وجود منحنی تکثیر در کانال Cy5 در CT کمتر از ۳۵.	معتبر
کنترل NTC	عدم حضور منحنی تکثیر سیگموتیدی در کانال FAM و Cy5 در CT کمتر از ۳۸	معتبر
کنترل مثبت	حضور منحنی تکثیر سیگموتیدی در کانال FAM نشان دهنده BI9 و منحنی تکثیر سیگموتیدی در کانال Cy5، نتیجه CT باید برای کانال سبز ۲۵-۲۷ و برای کانال قرمز ۲۸-۲۵ باشد.	معتبر

۳- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت جهت شناسایی B19 به روش Real-time PCR فعلی و نمونه های تهیه شده از نمونه های بیمار مثبت B19 RNA در سه غلظت مختلف مطابق با راهنمای "A⁺-EP-5" مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) بدست آمد. ضریب تغییرات دقت درونی سنجی کمتر از ۰/۲٪ و برون سنجی ۰/۲۵٪ محاسبه گردید. بدین ترتیب ضرایب تغییرات بدست آمده موید تکرار پذیری کیت شناسایی B19 به روش Real-time PCR فعلی می باشد.

۴- اختصاصیت (Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای "A⁺-EP-07" مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)، جهت تعیین واکنش متقاطع (cross reaction) کیت شناسایی B19 به روش Real-time PCR فعلی با سایر DNA و RNA ویروس ها واکنش متقاطع ندارد و اختصاصیت بالینی ۱۰۰ درصد است. همچنین تست روی ۸۳ نمونه خون کامل انجام شد که نتایج غیراختصاصی حاصل نشد. همچنین ارزیابی درصد تداخل از ناحیه مداخله گریهای گلیول قرمز، گلوکز، لاکتات، آلومین و لکوسیت انجام و مشخص گردید که تأثیری بر ردیابی RNA کیت شناسایی B19 ندارد.

۵- حساسیت (Sensitivity):

ارزیابی حساسیت مطابق با راهنمای "A⁺-EP-07" مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)، جهت تعیین حساسیت بالینی کیت شناسایی B19 به روش Real-time PCR فعلی در مقایسه با کیت مستقل دیگر روی ۷۵ نمونه بالینی انجام شد که میزان حساسیت بالینی ۱۰۰٪ با فاصله اطمینان (CI) ۹۵٪: ۹۹/۵٪-۱۰۰٪ حاصل شد. همچنین ارزش اخباری منفی و مثبت کیت شناسایی B19 به ترتیب ۱۰۰٪ با فاصله اطمینان (CI) ۹۵٪: ۹۹/۵٪-۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ با فاصله اطمینان (CI) ۹۵٪: ۹۹/۵٪-۱۰۰٪ می باشد.

۶- پدیده هوک:

در این کیت پدیده هوک تا ۱۰:CT مشاهده نگردید.

منابع و مراجع:

1. CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved

guideline.2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.

2. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.

3. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.

4. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation, <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>

5. Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine.19th ed. Mc Graw Hill Education.

6. McPherson R.A. et al. (2017). HENRY'S clinical diagnosis and management by laboratory Methods. 23rd ed. (pp. 4-373). Elsevier Inc.

7. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. (pp. 7-435). Elsevier Inc.

8. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. (pp. 8-1587) Elsevier Inc.

جدول نمادها:

	Catalog number	شماره رفرنس
	Batch code	سری ساخت
	In vitro diagnostic medical device	فرآورده تشخیصی و بالینی
	Data of manufacture	تاریخ تولید
	Expiry date	تاریخ انقضا
	Temperature limitation	دمای نگهداری
	Read instructions befor use	مطالعه بروشور
	Sufficient for n tests	محتویات برای n تست کافیست
	Caution consult accompanying documents	توجه به مدارک همراه
	Manufacturer	آدرس شرکت
	Keep away from sunlight	در جای تاریک نگهداری شود