

فلورسنت شناسایی می شود. قطعه ای از ژن انسانی (RNase P) در تیوب واکنش به عنوان کنترل داخلی استفاده می شود. کنترل داخلی باید همیشه در نمونه به مقدار کافی موجود باشد. 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.

عنوان محصول:

کیت تشخیص کیفی ویروس اپشتین بار به روش Real time PCR

معرفی محصول:

اپشتین بار ویروس از خانواده هرپس ویروسها ژنوم DNA دورشته‌ای دارد. EBV در سراسر جهان شیوع دارد. اکثر مردم در مقطعی از زندگی خود به EBV آلوده می شوند. EBV بیشتر از طریق مایعات بدن، در درجه اول بزاق، پخش می شود. ویروس اپشتین بار می تواند باعث مونونوکلئوز عفونی (IM) شود و همچنین ممکن است منجر به برخی بیماری های آلرژیک، لنفوم و خود ایمنی شود. از جمله علائم مبتلا به این ویروس خستگی و بی حالی، تب، التهاب و درد در ناحیه گلو، تورم غدد لنفاوی در ناحیه گردن، بزرگ شدن طحال، تورم در کبد و ایجاد راش های پوستی می باشد. هرپس ویروس معمولاً با تماس مستقیم با فرد بیمار انتقال می یابند، اما برای مدت طولانی در محیط پایدار نیستند. اگرچه تولید واکسن برای ویروس های این خانواده با مشکلات فراوانی روبرو بوده است، اما داروهای ضد ویروسی در برخی از اعضای این خانواده (بجز EBV) اثرات مطلوبی داشته است. آزمایش PCR برای جستجوی DNA ویروس EBV به تشخیص زود هنگام عفونت ویروس اپشتین بار در بدن میزبان، به منظور پیشگیری از بروز عوارض شدید که می تواند تاثیر نامطلوبی بر پیش آگهی بگذارد، ضروری است. این کیت آزمایشگاهی جهت شناسایی کیفی ویروس اپشتین بار در نمونه بالینی پلاسما طراحی گردیده است.

اساس آزمایش:

این کیت بر مبنای روش Real time PCR با استفاده از پروب برای شناسایی کیفی اپشتین بار مبتنی بر تکثیر قطعات DNA ویروس اپشتین بار (EBV) است. تجزیه و تحلیل Real-time PCR برای حضور این عوامل در ا تیوب انجام می شود که عامل در کانال

محتویات کیت:

جدول ۱: معرف های کیت

معرف	برچسب	۲۴ تستی	۴۸ تستی	۹۶ تستی
مخلوط واکنش اپشتین بار	MEBV	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. میکروسانتریفیوز
۵. میکسر رومیزی
۶. دستگاه ارزیابی و کالیبر Real-time PCR با حداقل ۳ کانال FAM/VIC/JOE (زرده)، Quasar/CY۵ (قرمز) یا نارنجی (ROX/Texas 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

دستگاه های سازگار با کیت:

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

نگهداری کیت:

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای 20°C - 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 بر روی 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 و پلاسما
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 2°C تا 8°C درجه سانتیگراد نگهداری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در 20°C - 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 بر روی آنها ممکن است منجر به نتایج کاذب شود.

نکات مهم در انجام تست:

۱. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که

دماي کليه اجزاء کيت به دماي اتاق رسیده باشد.
۲. معرف ها و نمونه ها را قبل از آرمایش بخوبي مخلوط نماييد.

۳. بهتر است کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتايي (Duplicate) آرمایش کنید و ميانگين CT جهت محاسبه نتايج مورد استفاده قرار گيرد.

۴. فرآيند پيپتينگ از اهميت بسيار بالايي برخوردار است. پيپتينگ ناکافي باعث تغيير غلظت مناسب مسترميکس و پرايمر و پروب ها خواهد شد.

۵. در هر بار انجام آرمایش کنترل مثبت کيت بايد استفاده شود تا کارائي واکنش مورد ارزيابي قرار گيرد.

۶. در کليه مراحل انجام آرمایش و متعاقب هر مرحله پيپتينگ، تيوب ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به تيوب از محيط خارج شوند.

۷. هر نوع نمونه يا ماده کنتري که حاوي رنگ باشد، با اين کيت سازگار نبوده و آرمایش برروي آنها ممکن است منجر به نتايج کاذب شود.

روش انجام آرمایش:

آماده سازی قبل از واکنش Real-time PCR:

با استفاده از کيت های تخليص ژنوم ويروس، نسبت به استخراج DNA ويروسي، از نمونه باليني اقدام شود. لازم به ذکر است اين محصول در بردارنده کيت استخراج DNA نيست ولي با بيشتر کيت های تخليص اسيد نوکلئیک مانند Roche همخواني دارد.

آماده سازی مخلوط واکنش Real-time PCR

کيفی تک مرحله ای:

اسيد نوکلئیک استخراج شده مستقيما در واکنش qPCR مورد استفاده قرار مي گيرد. ابتدا در محل مناسب و استريل، محتويات کيت را از داخل بسته بندی خارج کرده و اجازه دهيد تا در دماي اتاق ذوب شوند. مراحل مطابق با مراحل زير انجام می شود:

۱- در کليه آرمایشات برای هر بیمار ۱ ميکروتيوب همراه با ميکروتيوب های کنترل مثبت و منفي و NTC نام گذاری نماييد.

۲- جهت انجام آرمایش، مواد و واکنش-گر را روی يخ قرار دهيد.

۳- ۱۵ ميکروليتر از هر کدام از MEBV به تمامی

ميکروتيوب های نام گذاری شده اضافه کنید.

۴- ۵ ميکروليتر آب مقطر استريل را به ميکروتيوب NTC اضافه کنید.

۵- ۵ ميکروليتر کنترل منفي به ميکروتيوب هايی که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.

۶- ۵ ميکروليتر از کنترل مثبت در يک فضای دور از محوطه آماده سازی ساير مخلوطهای واکنش به تيوب واکنش کنترل مثبت اضافه کنید.

۷- ۵ ميکروليتر از DNA نمونه بيماران را به ميکروتيوب هايی که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.

۸- محتويات ميکروتيوب ها را خوب مخلوط کرده و يا Spin کوتاه انجام دهيد.

جدول ۲: مقادير واکنش

میزان مورد نیاز برای هر تست	مواد مورد نیاز برای هر تست
۱۵ ميکروليتر	مخلوط واکنش ويروس ايشئين بار
۵ ميکروليتر	الگو (کنترل منفي، DNA بيمار، کنترل مثبت)
۲۰ ميکروليتر	حجم نهائی واکنش

انجام واکنش Real-time PCR:

تيوب های واکنش را در دستگاه Real time PCR قرار دهيد و برنامه دمایی زير را اجرا کنید. مشخصات تيوب های واکنش و نوع خوانش فلورسنت در هر تيوب را در جدول زير مشاهده می کنید.

جدول ۳ : مشخصات تيوب های واکنش و نوع

خوانش تارگت های کيت

تارگت ها	EBV
ويروس ايشئين بار	FAM
کنترل داخلي	CY۵

پس از انجام تنظيمات و انتخاب کانال خوانش، فايل را ذخيره کرده و دستگاه را با برنامه دمائی و زمانی زير راه اندازی کنید.

جدول ۴: مشخصات واکنش حرارتي

تعداد سيکل	زمان	دما (C-)	مراحل
۱	۵ min	۹۵	Initial Denaturation
۴۰	۲۰ sec	۹۵	Annealing / Extension
۴۰	۳۰ sec	۵۵*	(FAM/CY5)

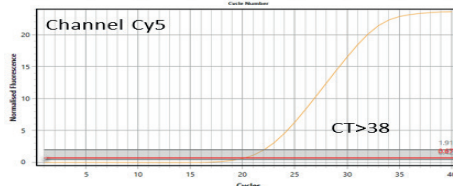
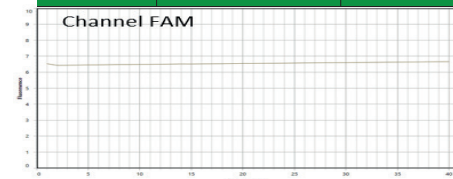
* مرحله ای که خوانش انجام شود.

محاسبه نتایج:

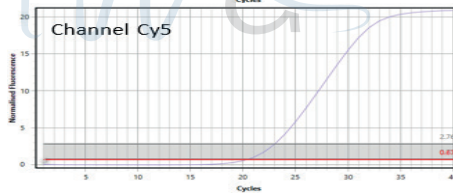
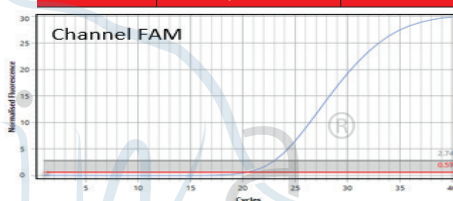
پس از اتمام واکنش، نتایج ذخیره شده را مطابق با جداول زیر آنالیز کنید.

تصویر ۱: نتایج تفسیری تیوب واکنش در کیت

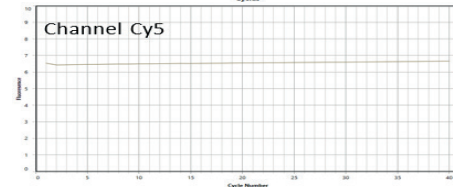
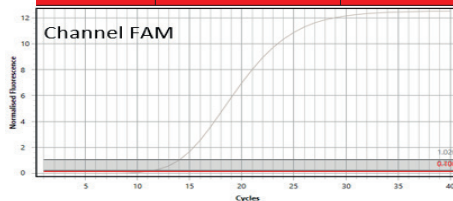
جواب	تفسیر	نتیجه
منفی	EBV: ویروس اپشتین بار	معتبر



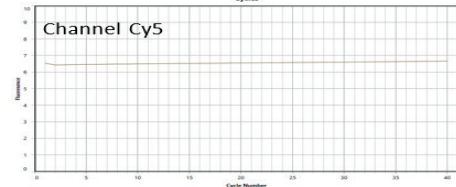
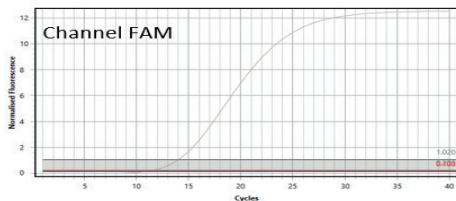
جواب	تفسیر	نتیجه
مثبت	EBV: ویروس اپشتین بار	معتبر



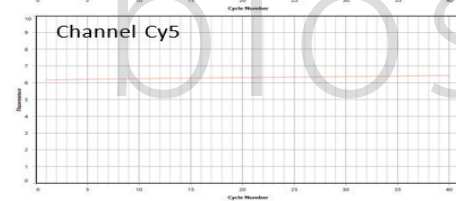
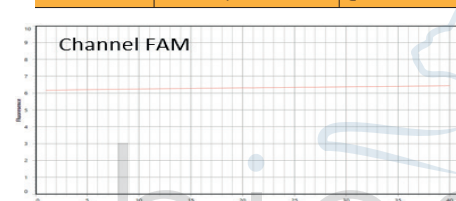
جواب	تفسیر	نتیجه
مثبت	EBV: ویروس اپشتین بار	معتبر



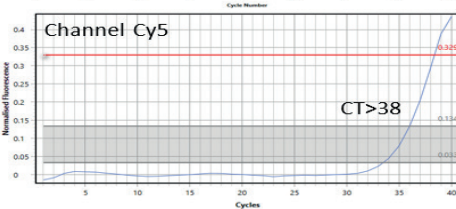
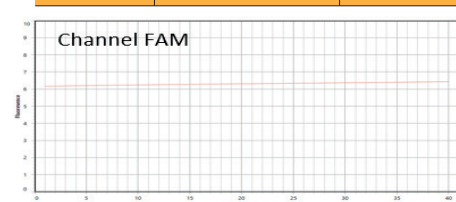
جواب	تفسیر	نتیجه
مثبت	EBV: ویروس اپشتین بار	معتبر



جواب	تفسیر	نتیجه
تکرار استخراج	EBV: ویروس اپشتین بار	نامعتبر



جواب	تفسیر	نتیجه
تکرار استخراج	EBV: ویروس اپشتین بار	نامعتبر



جدول ۵: تفسیر نتایج کیت

فارها	مورد انتظار و معیتر	نتیجه و تفسیر
کنترل منفی	عدم حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM یا CT کمتر از ۳۸ و وجود منحنی تکثیر در کانال CY۵ در CT کمتر از ۳۵.	معتبر
کنترل NTC	عدم حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و CY۵ یا CT کمتر از ۳۸	معتبر
کنترل مثبت	حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM نشان دهنده EBV و منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال CY۵، نتیجه CT باید برای کانال سبز ۲۳-۱۹ و کانال قرمز ۲۸-۲۵ باشد.	معتبر
EBV	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و منحنی تکثیر در کانال CY۵ در CT کمتر از ۳۵	مثبت
EBV	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و عدم منحنی تکثیر در کانال CY۵ در CT کمتر از ۳۵	مثبت
EBV	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و منحنی تکثیر در کانال CY۵ در CT بالاتر از ۳۵	تکرار استخراج و در صورت تکرار همین نتیجه: مثبت
EBV	عدم تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و عدم منحنی تکثیر در کانال CY۵	تکرار استخراج و در صورت تکرار همین نتیجه: تکرار نمونه گیری
EBV	عدم تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و منحنی تکثیر در کانال CY۵ در CT پایین تر از ۳۵	منفی

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

کنترل کیفی:

در هر کیت علاوه بر مسترمیکس دو میکروتیوب شامل کنترل منفی و مثبت وجود دارد که مشخصات هر یک بر روی برچسب ویال درج شده است. علاوه بر کنترل های داخل کیت، کارشناس آزمایشگاه می تواند از نمونه های مثبت که در خود آزمایشگاه تهیه شده نیز استفاده نماید.

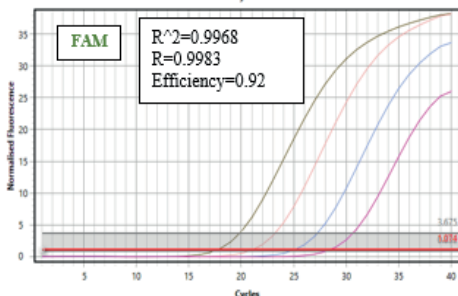
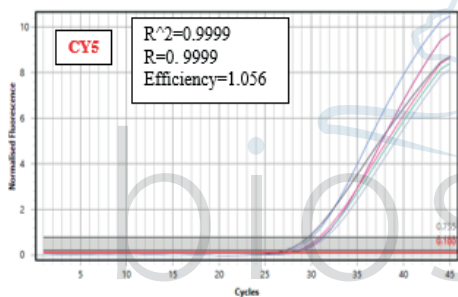
خصوصیات اجرایی کیت:

۱- حد پایینی اندازه گیری (Lower limit of measurement):
حد آشکار سازی (Limit-of-detection: LOD)،

مطابق با راهنمای EPIV-A⁺ مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) بدست آمد. برای تعیین حد آشکار سازی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس ویروس اپشتین بار بررسی شده است و معادل یک و نیم واحد در میلی لیتر می باشد. یعنی در ۹۵% مواردی که تیترو ویروس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیترو نمونه به کمتر از این میزان اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود.

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.



۳- خطی بودن (Linearity):

خطی بودن این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس اپشتین بار بررسی شده است و شامل بازه دو میلیون و پانصد هزار واحد در میلی لیتر تا پنج واحد در میلی لیتر می باشد.

۴- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت

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.

شناسایی کیفی ویروس اپشتین بار (EBV) به روش Real-time PCR فعلی و نمونه های تهیه شده از نمونه های بیمار مثبت در سه غلظت مختلف مطابق با راهنمای "A-EP-05" مؤسسه استاندارد های بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) بدست آمد. ضریب تغییرات دقت درونی سنجی کمتر از ۵/۰٪ و برون سنجی ۲۵/۰٪ محاسبه گردید. بدین ترتیب ضرایب تغییرات بدست آمده موید تکرار پذیری کیت شناسایی کیفی ویروس ویروس اپشتین بار به روش Real-time PCR فعلی می باشد.

۵- اختصاصیت (Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای "A-EP-07" مؤسسه استاندارد های بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)، جهت تعیین واکنش متقاطع (cross reaction) کیت شناسایی کیفی ویروس اپشتین بار به روش Real-time PCR فعلی با سایر DNA ویروس ها مختلف شامل هرپس سیمپلکس ویروس تایپ ۱ و ۲، سیتومگالوویروس، HHV-۶-۷-۸، آدنوویروس، HCV، HBV، VZV، ایتروویروس، ویروس تب نیل غربی و ویروس B19 واکنش متقاطع ندارد و اختصاصیت بالینی ۱۰۰ درصد است. همچنین ارزیابی درصد تداخل از ناحیه مداخله گره های آلبومین، گلوکز، بیلی روبین، چربی، اوره، اسید اوریک و گلبول قرمز انجام و مشخص گردید که تأثیری بر ردیابی ویروس ویروس اپشتین بار (EBV)، ندارد.

۶- حساسیت (Sensitivity):

ارزیابی حساسیت مطابق با راهنمای "A-EP-07" مؤسسه استاندارد های بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)، جهت تعیین حساسیت بالینی کیت شناسایی کیفی ویروس اپشتین بار به روش Real-time PCR فعلی در مقایسه با کیت مستقل دیگر روی ۱۷۰ نمونه بالینی مثبت و ۱۰۰ نمونه منفی از نظر اپشتین بار مدنظر انجام شد که میزان حساسیت بالینی ۹۹/۳٪ (۹۵٪ CI: ۹۶/۷-۱۰۰٪) حاصل شد.

۷- پدیده هوک:

در این کیت پدیده هوک تا ۹:CT مشاهده نگردید.

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