

محتویات کیت:

جدول ۱: معرف های کیت

معرف	برجسب	۲۴ تستی	۴۸ تستی	۹۶ تستی
مخلوط واکنش ENT	MENT	۳۶۰ µl/Vial	۲ × ۳۶۰ µl/Vial	۴ × ۳۶۰ µl/Vial
مخلوط آنزیمی	RT Enzyme	۲۴ µl/Vial	۲ × ۲۴ µl/Vial	۴ × ۲۴ 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

عنوان محصول:

کیت شناسایی انتروویروس به روش Real time PCR

معرفی محصول:

انتروویروس ها بر اساس پاتوژن آنها در انسان و حیوان، به چهار گروه، فلج اطفال (پولیو ویروس ۱-۳)، انتروویروس های A-L (ویروس های کوکساکسی A و B، و اکوویروس ها)، انترو ویروس D۶۸، انترو ویروس AVI طبقه بندی شدند، اما به سرعت بر اساس خواص بیولوژیکی این گروه توسعه بیشتری پیدا کرد. سه انتروویروس غیر فلج اطفال شناخته شده اند که به ترتیب معمولاً باعث بیماری تنفسی و بیماری دست، پا و دهان می شوند. ترکیبی از انتروویروس ها هر ساله در گردش هستند و انواع مختلفی می توانند در سال های مختلف رایج باشند. اکثر افرادی که به انتروویروس های غیر فلج اطفال آلوده می شوند، بیمار نمی شوند یا فقط بیماری خفیفی مانند سرماخوردگی دارند. علائم بیماری خفیف می تواند شامل تب، آبریزش بینی، عطسه، سرفه، بثورات پوستی، تاول های دهان و دردهای بدن و عضلات باشد.

اساس آزمایش:

این کیت بر مبنای روش Real time PCR Multiplex با استفاده از پروب برای شناسایی انتروویروس ها طراحی شده است. این روش مبتنی بر تکثیر قطعات RNA انتروویروس ها 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 RNA و تقویت Real-time PCR) بلکه ارزیابی کفایت نمونه برداری و ذخیره سازی مواد بالینی را ممکن می سازد.

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 کالبر Real-time PCR با

حداقل ۳ کانال HEX/VIC/JOE (زرد)،

Quasar/CY۵ ۶۷۰ (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 HEX/VIC/HEX (زرد)، سبز (FAM)،

Quasar/CY۵ ۶۷۰ (قرمز) یا /ROX /Texas Red

(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.

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 را 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 مخصوصا 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

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: مایع مغزی-نخاعی (CSF)

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 -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.

دماي کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.

۲. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.

۳. بهتر است کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی (Duplicate) آزمایش کنید و میانگین CT جهت محاسبه نتایج مورد استفاده قرار گیرد.

۴. فرآیند پیپتینگ از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. پیپتینگ ناکافی باعث تغییر غلظت مناسب مسترمیکس و پرایمر و پروب ها خواهد شد.

۵. در هر بار انجام آزمایش کنترل مثبت کیت باید استفاده شود تا کارائی واکنش مورد ارزیابی قرار گیرد.

۶. 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.

۷. 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.

روش انجام آزمایش:

آماده سازی قبل از واکنش Real-time PCR:

اسید نوکلئیک استخراج شده مستقیماً در واکنش qRT-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- ۱۴ میکرولیتر از ENT و یک میکرولیتر از تیوب مخلوط آنزیمی 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 مخلوطهای واکنش به تیوب واکنش کنترل مثبت اضافه کنید.

۷- ۵ میکرولیتر از RNA 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

میزان مورد نیاز برای هر تست	مواد مورد نیاز برای هر تست
۱۴ میکرولیتر	مخلوط واکنش ENT
۱ میکرولیتر	مخلوط آنزیمی
۵ میکرولیتر	الگو (کنترل منفی، DNA بیمار، کنترل مثبت)
۲۰ میکرولیتر	حجم نهائی واکنش

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

تارگت ها	ENT
عوامل (پولیو ویروس ۱-۳)، اتررو ویروس های A-L (ویروس های کوکساکسی A و B، و اکو ویروس ها)، اتررو ویروس D۶۸، اتررو ویروس AV۱	HEX
کنترل داخلی	CY۵

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

جدول ۴: مشخصات واکنش حرارتی

تعداد سیکل	زمان	دما (°C)	مراحل
۱	۱۰ min	۵۰	Reverse transcription
۱	۵ min	۹۵	Initial Denaturation
۴۰	۲۰ sec	۹۵	Annealing/ Extension
۴۰	۴۰ sec	۶۰*	(HEX/CY5)

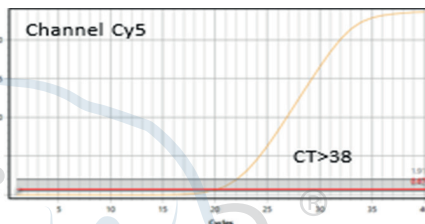
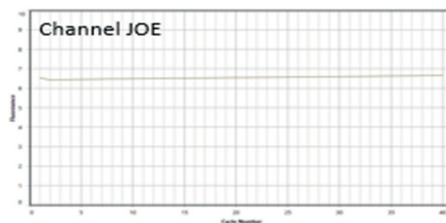
* مرحله ای که خوانش انجام شود.

محاسبه نتایج:

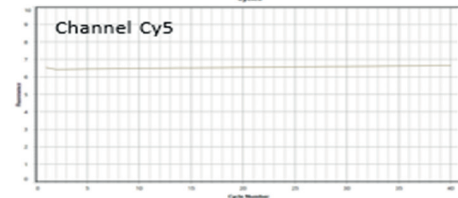
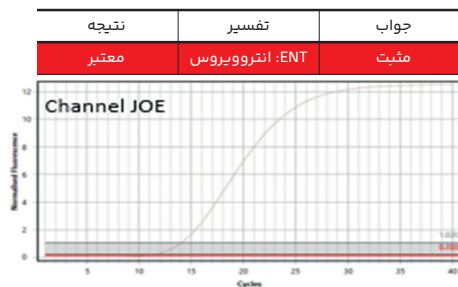
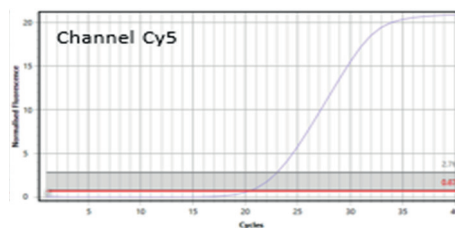
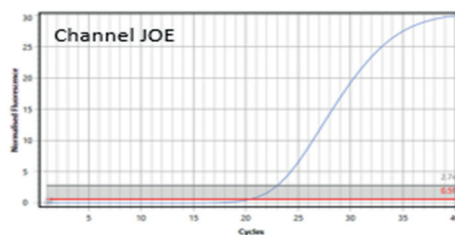
پس از اتمام واکنش، نتایج ذخیره شده را مطابق با جداول زیر آنالیز کنید.

تصویر ۱: نتایج تفسیری تیوب واکنش در کیت

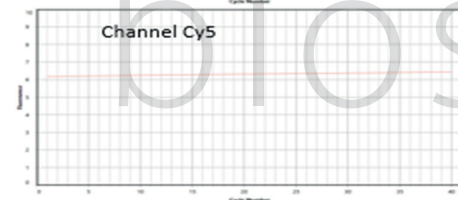
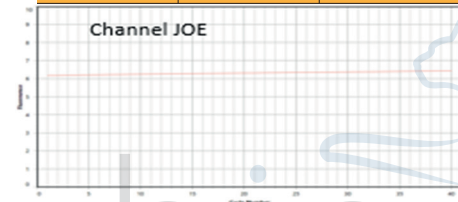
جواب	تفسیر	نتیجه
منفی	ENT: انتروویروس	معتبر



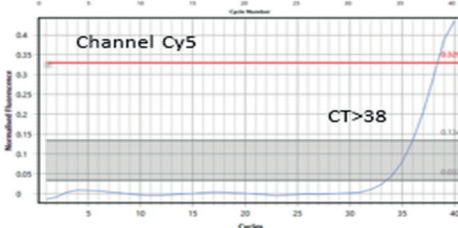
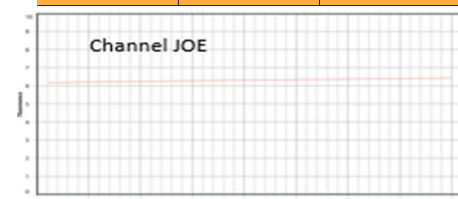
جواب	تفسیر	نتیجه
مثبت	ENT: انتروویروس	معتبر



جواب	تفسیر	نتیجه
تکرار استخراج	ENT: انتروویروس	نامعتبر



جواب	تفسیر	نتیجه
تکرار استخراج	ENT: انتروویروس	نامعتبر



جدول ۵: تفسیر نتایج کیت

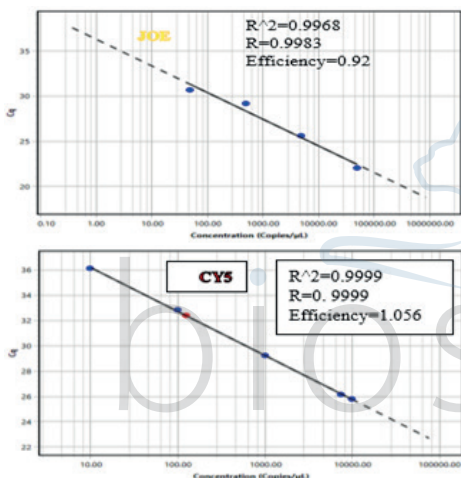
فارها	مورد انتظار و معیتر	نتیجه و تفسیر
کنترل منفی	عدم حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال HEX یا CT کمتر از ۳۸ و وجود منحنی تکثیر در کانال Cy۵ در CT کمتر از ۳۵.	معتبر
کنترل NTC	عدم حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال HEX و Cy۵ یا CT کمتر از ۳۸	معتبر
کنترل مثبت	حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال HEX نشان دهنده انتروویروس ها و منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال Cy۵ و برای کانال زرد ۲۲-۲۴ و کانال قرمز ۲۷-۲۵ باشد.	معتبر
ENT	حضور تکثیر در کانال HEX نشانه مثبت بودن نمونه از لحاظ انتروویروس ها. منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال Cy۵ و CT کمتر از ۳۵	مثبت
ENT	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال HEX و عدم منحنی تکثیر در کانال Cy۵ یا CT کمتر از ۳۵ حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال HEX و منحنی تکثیر در کانال Cy۵ یا CT بالاتر از ۳۵	مثبت
ENT	عدم تکثیر سیگموئیدی در کانال HEX و عدم منحنی تکثیر در کانال Cy۵	تکرار استخراج و در صورت تکرار همین نتیجه: مثبت
ENT	عدم تکثیر سیگموئیدی در کانال HEX و منحنی تکثیر در کانال Cy۵ یا CT پائین تر از ۳۵	تکرار استخراج و در صورت تکرار همین نتیجه: تکرار نمونه گیری
ENT	حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال HEX یا CT ۳۳ تا ۳۸، در صورتیکه علائم بیمار در دوره بالینی با نتایج تست منطبق باشد میتواند با تکرار تست، در صورت تکرار نتیجه بصورت مثبت گزارش کنید.	منفی
ENT	عدم تکثیر گراف سیگموئیدی در کانال HEX یا CT ۳۳ تا ۳۸، در صورتیکه علائم بیمار مشکوک با نتیجه تست منطبق نباشد.	مثبت
ENT	حضور گراف سیگموئیدی در کانال Cy۵ در CT پائین تر از ۳۲، بعد از تکرار تست و تکرار نتیجه، مثبت گزارش شود.	مثبت
ENT	عدم تکثیر گراف سیگموئیدی در کانال HEX یا CT ۳۳ تا ۳۸، در صورتیکه بیمار علائمی از بیماری نداشته باشد، بعد از تکرار تست در صورت تکرار نتیجه، نتیجه منفی گزارش شود.	منفی

خصوصیات اجرایی کیت:

۱- حد پایینی اندازه گیری (Lower limit of measurement):
برای تعیین حد آشکار سازی کیفی ۲۰ اندازه گیری
تکراری بر روی یک نمونه با CT پائین (CT بالاتر از
۳۰) که نتیجه آن به روش مستقل دیگری تعیین
شده بود، انجام شد. نهایتاً LOD کیت جهت
شناسایی انتروویروس به روش Real-time PCR
معادل CT: ۳۹/۵ می باشد.

۲- رنج دینامیک (Dynamic Range):

رنج دینامیک و رنج خطی کیت موجود برابر با 10^1 تا 10^9
می باشد. و ضریب همبستگی واکنش (r^2) در حدود
۰/۹۹۹ می باشد. همچنین بازده (Efficiency) واکنش
در کانال های مختلف برابر با ۹۸٪ تا ۹۹٪ است.



۳- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت
جهت شناسایی انتروویروس به روش Real-time
PCR فعلی و نمونه های تهیه شده از نمونه های
بیمار مثبت RNA انتروویروس در سه غلظت
مختلف بدست آمد. ضریب تغییرات دقت درونی
سنجی کمتر از ۱٪ و برون سنجی کمتر از ۲٪
محاسبه گردید. بدین ترتیب ضرایب تغییرات
بدست آمده موید تکرار پذیری کیت شناسایی
انتروویروس به روش Real-time PCR می باشد.

۴- اختصاصیت (Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای EP۰۷-A۳
مؤسسه استانداردهای بالینی و
آزمایشگاهی (CLSI)، جهت تعیین واکنش
مقاطع (cross reaction) کیت شناسایی

<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 before use	مطالعه بروشور
	Sufficient for n tests	محتویات برای n تست کافیت
	Caution consult accompanying documents	توجه به مدارک همراه
	Manufacturer	آدرس شرکت
	Keep away from sunlight	در جای تاریک نگهداری شود

انتروویروس 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 ۳۰۰ نمونه مایع مغزی نخاعی انجام شد که نتایج غیراختصاصی حاصل نشد. همچنین ارزیابی درصد تداخل از ناحیه مداخله گره های گلوکز، لاکتات، آلبومین و لکوسیت انجام و مشخص گردید که تأثیری بر ردیابی RNA کیت شناسایی انتروویروس ندارد.

۵- حساسیت (Sensitivity):

ارزیابی حساسیت مطابق با راهنمای EP۰۷-A^۲ مؤسسه استاندارد های بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)، جهت تعیین حساسیت بالینی کیت شناسایی انتروویروس به روش Real-time PCR فعلی در مقایسه با کیت مستقل دیگر ۱۵۰ نمونه بالینی که با توجه به نتایج ارزیابی بالینی، مننژیت ویروسی تشخیص داده شده بود، انجام شد که میزان حساسیت بالینی (۹۵٪ CI: ۹۴٫۸-۹۹٫۲٪)؛ ۹۹٫۱۳٪ حاصل شد. همچنین ارزش اخباری منفی و مثبت کیت شناسایی انتروویروس به ترتیب ۹۷٫۲۲٪ (۹۵٪ CI: ۹۲٫۹-۹۸٫۸٪) و ۹۹٫۵۶٪ (۹۵٪ CI: ۹۹٫۱-۱۰۰٪) می باشد.

۶- پدیده هوک:

در این کیت پدیده هوک تا ۹: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 biological variation,