

عنوان محصول:

کیت تشخیص کیفی هپاتیت B به روش Real time PCR

معرفی محصول:

ویروس هپاتیت (HBV) یک DNA ویروس از خانواده ویروس های Hepadnaviridae است که در ۸ ژنوتیپ (A-H) یافت می شود. HBV متشکل از یک نوکلئوکسپید و پوسته ای از لیپیدهای سلول میزبان و پروتئین های سطحی ویروسی می باشد. HBsAg توسط سلولهای آلوده به میزان ۱۰۰ برابر از ویروسهای کامل ترشح می شود. HBV ژنوم خود را با استفاده از یک مرحله بینابینی- RNA تکثیر می کند ، به طوری که ژنوم HBV می تواند تا حدی در ژنوم سلول کبدی ادغام شود. بنابراین HBsAg می تواند بدون نسخه برداری ویروس (virus replication) ، همچنان در سطح بالا تولید شود. وجود این مرحله بینابینی- RNA در حقیقت تنوع نسبتا بالای HBV را که برای یک DNA- ویروس غیر معمول است ، توضیح می دهد. بخصوص در شرایط تحت درمان ممکن است که سریعاً گونه هایی از (HBV-variants) HBV ایجاد شوند که سیستم ایمنی بدن را تضعیف می کنند یا در برابر داروهای ضد ویروسی مقاوم هستند. HBV خودی خود سیتوپاتوزن نیست. علائم عفونت HBV عمدتاً بر اساس دفاع ایمنی سلولی میزبان در برابر سلولهای آلوده کبدی است. عفونت HBV از طریق تماس جنسی ، تماس با خون یا ترشحات آلوده و همچنین از زنان باردار آلوده به نوزاد منتقل می شود (خطر ۵٪). اگر غلظت HBV زیاد باشد ، از میکرولیتر خون برای انتقال عفونت (از طریق ضایعات پوستی و غشای مخاطی) کافی است. در ناقلین ویروس های عفونی در ادرار ، بزاق ، مایع منی ، صفرا و شیر مادر نیز یافت می شوند. خطر ابتلا به عفونت HBV از یک بیمار با شاخص HBsAg مثبت ، پس از آسیب دیدگی توسط سوزن (Needle stick injury) حدود ۱۰-۳۰٪ است . البته این مسئله به بار ویروسی بیمار شاخص ، شدت آسیب و میزان مایع عفونی منتقل شده نیز بستگی دارد. آزمایش

PCR برای جستجوی DNA ویروس HBV به تشخیص زود هنگام عفونت ویروس هپاتیت B در بدن میزبان، به منظور پیشگیری از بروز عوارض شدید که می تواند تاثیر نامطلوبی بر پیش آگهی بگذارد، ضروری است. کیت آزمایشگاهی جهت شناسایی کیفی ویروس هپاتیت B در نمونه های بالینی پلاسما طراحی گردیده است.

اساس آزمایش:

این کیت بر مبنای روش Real time PCR Multiplex استفاده از پروب TaqMan خاص برای شناسایی کیفی ویروس هپاتیت B طراحی شده است. این روش مبتنی بر تکثیر همزمان (Multiplex PCR) قطعات DNA ویروس هپاتیت (HBV) B است. تجزیه و تحلیل Real-time PCR برای حضور این عوامل در ا تیوب انجام می شود که عامل در کانال فلورسنت زرد 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.

محتویات کیت:

جدول ۱: معرف های کیت

معرف	برچسب	۲۴ تستی	۴۸ تستی	۹۶ تستی
مخلوط واکنش ویروس هپاتیت B	MHBV	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 کالبر Real-time PCR با

حداقل ۳ کانال FAM/VIC/JOE (زرد)، Quasar/CY5

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 DNase و RNase

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/JOE (قرمز)، Quasar/CY5 ۶۷۰ (زرد)، 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 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 ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در ۲۰C- 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 نشتی 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 دمای 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:

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

qPCR 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 امیکروتیوب همراه با میکروتیوب های کنترل مثبت و منفی و NTC نام گذاری نمایید.

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

۳- ۱۵ میکرولیتر از هر کدام از HBVM 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 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 با Spin کوتاه انجام دهید.

جدول ۲: مقادیر واکنش

میزان مورد نیاز برای هر تست	مواد مورد نیاز برای هر تست
۱۵ میکرولیتر	مخلوط واکنش ویروس هپاتیت B
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	HBV
ویروس هپاتیت B	HEX
کنترل داخلی	CY۵

نتیجه	تفسیر	جواب
معتبر	HBV: ویروس هپاتیت B	منفی

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	۵ min	۹۵	Initial Denaturation
۴۰	۲۰ sec	۹۵	Annealing/ Extension
۴۰	۳۰ sec	۵۵*	(HEX/CY5)

* مرحله ای که خوانش انجام شود.

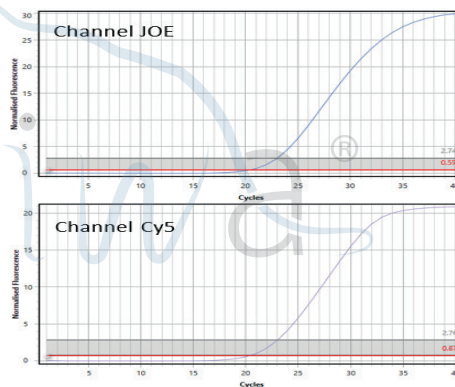
محاسبه نتایج:

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

تصویر ۱: نتایج تفسیری تیوب واکنش در کیت

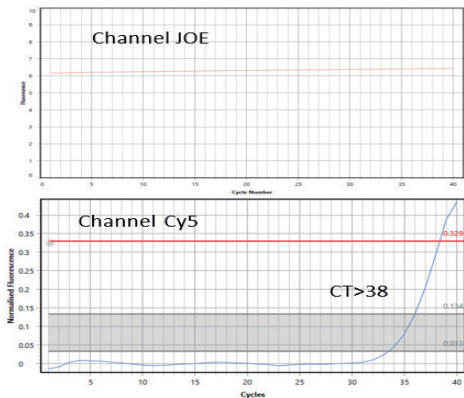
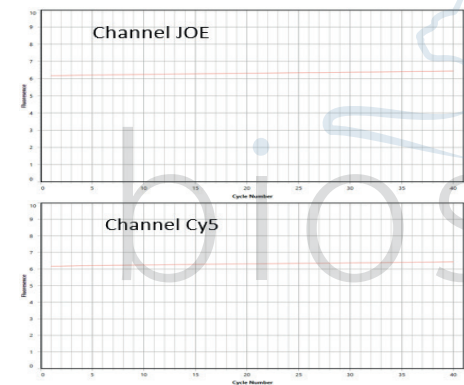
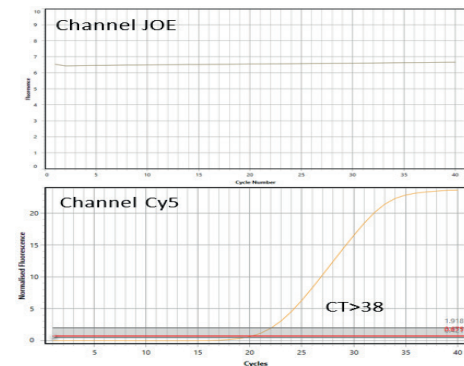
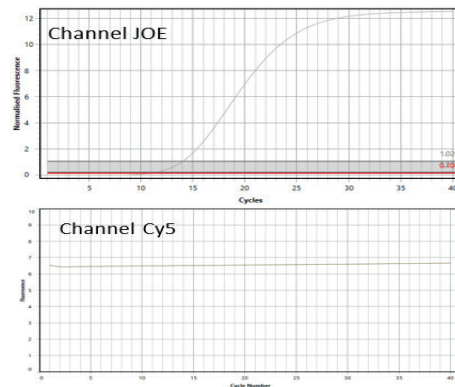
نتیجه	تفسیر	جواب
نامعتبر	HBV: ویروس هپاتیت B	تکرار استخراج

نتیجه	تفسیر	جواب
معتبر	HBV: ویروس هپاتیت B	مثبت



نتیجه	تفسیر	جواب
نامعتبر	HBV: ویروس هپاتیت B	تکرار استخراج

نتیجه	تفسیر	جواب
معتبر	HBV: ویروس هپاتیت B	مثبت



جدول ۵: تفسیر نتایج کیت

فازها	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 HBV و منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال CY۵، نتیجه CT باید برای کانال HEX ۱۹-۲۳ باشد.	معتبر
HBV	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال HEX و منحنی تکثیر در کانال CY۵ در CT کمتر از ۳۵	مثبت
HBV	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال HEX و عدم منحنی تکثیر در کانال CY۵ در CT کمتر از ۳۵	مثبت
HBV	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال HEX و منحنی تکثیر در کانال CY۵ در CT بالاتر از ۳۵	تکرار استخراج و در صورت تکرار همین نتیجه: مثبت
HBV	عدم تکثیر سیگموئیدی در کانال HEX و عدم منحنی تکثیر در کانال CY۵	تکرار استخراج و در صورت تکرار همین نتیجه: تکرار نمونه گیری
HBV	عدم تکثیر سیگموئیدی در کانال HEX و منحنی تکثیر در کانال CY۵ در CT پائین 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، 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.

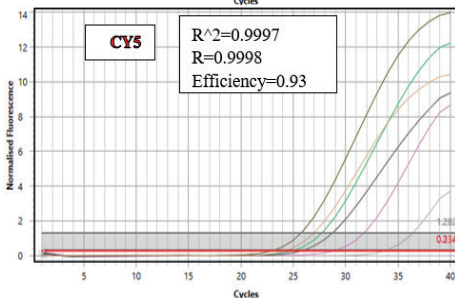
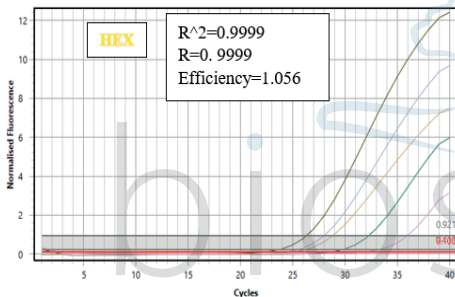
خصوصیات اجرایی کیت:

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 و ویروس هپاتیت B 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 و ویروس هپاتیت B 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 و ویروس هپاتیت B (HBV) به روش Real-time PCR فعلیو 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 ۰٫۵٪ و برون سنجی ۰٫۲۵٪ محاسبه گردید. بدین ترتیب ضرایب تغییرات بدست آمده موید تکرار پذیری کیت شناسایی کیفی ویروس و ویروس هپاتیت B 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 و ویروس هپاتیت B به روش Real-time PCR فعلی با سایر DNA ویروس ها مختلف شامل هرپس سیمپلکس ویروس تایپ او ۲، ایشتن بار ویروس، HHV-۶-۷-۸، آدنوویروس، HCV، CMV، VZV، انتروویروس، ویروس تب نیل غربی و ویروس B۱۹ 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 و ویروس هپاتیت B (HBV) 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 و ویروس هپاتیت B به روش Real-time PCR فعلی در مقایسه با کیت مستقل دیگر روی ۱۷۰ نمونه بالینی مثبت و ۱۰۰ نمونه منفی از نظر ویروس هپاتیت B 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	فروزرده 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