

محتویات کیت:

جدول ۱: معرف های کیت

معرف	برچسب	۲۴ تستی	۴۸ تستی	۹۶ تستی
مخلوط واکنش اوربون	MMUMP	۳۳۶ µl/Vial	۲ × ۳۳۶ µl/Vial	۴ × ۳۳۶ 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 اوربون به روش Real time PCR

معرفی محصول:

ویروس اوربون عامل بیماری اوربون است. قبل از معرفی واکسیناسیون روتین، زمانی یک بیماری رایج دوران کودکی در سراسر جهان بود و هنوز هم در جهان سوم است. ویروس اوربون متعلق به جنس Rubulavirus از خانواده Paramyxoviridae است که انتقال آن عمدتاً از طریق مسیر آئروسل یا تماس مستقیم است، اما می تواند از طریق تماس با اشیاء آلوده نیز پخش شود. این ویروس در گلو قرار می گیرد اما از طریق جریان خون منتشر می شود و به آن اجازه می دهد تا اندام های مختلف مانند غدد بزاقی، بیضه ها، تخمدان ها، پانکراس و مغز را آلوده کند. دوره نهفتگی ویروس اوربون معمولاً ۲۴-۱۲ روز است. عفونت در ۲۰ تا ۳۰ درصد موارد می تواند بدون علامت باشد. علائم کلاسیک شامل تب، سردرد، درد صورت، کسالت، تورم یک طرفه یا دو طرفه غدد بناگوشی و فک و ارکیت در مردان است. سیستم عصبی مرکزی تقریباً در ۵۰٪ موارد تحت تأثیر قرار می گیرد و عوارض جدی تر شامل ناشنوایی است. این کیت جهت شناسایی اوربون در نمونه های بالینی طراحی گردیده است.

اساس آزمایش:

این کیت بر مبنای روش Real time PCR با استفاده از پروب برای شناسایی اوربون مبتنی بر تکثیر قطعات RNA اوربون طراحی شده است. تجزیه و تحلیل Real-time PCR برای حضور این عوامل در یک تیوب انجام می شود که در کانال فلورسنت سبز 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)،

ROX/Texas (قرمز) یا نارنجی Quasar/CY5 ۶۷۰ (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

دستگاه های سازگار با کیت:

این کیت بر روی تمامی دستگاه های Real time

PCR دارای کانال سبز (FAM)، Quasar/CY5 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.

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 محلول‌ها (بیش از ۳ مرتبه) خودداری شود.

۳. کلیه معرف‌ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج بروی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای مذکور پایدار هستند.

۴. اجزاء کیت‌ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه‌جایی درب معرف‌ها بپرهیزید.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱. نوع نمونه: مایع مغزی-نخاعی (CSF)
۲. شرایط نمونه‌گیری: جمع‌آوری بر اساس شرایط و نوع نمونه طبق پروتکل‌های موجود انجام گیرد.

۳. نگهداری نمونه: نمونه دریافت شده می‌تواند بلافاصله برای آزمایش مورد استفاده قرار گیرد. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع‌آوری نمونه امکان‌پذیر نباشد، می‌توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری کرد. برای مدت طولانی‌تر نمونه‌ها باید در ۲۰°C- سانتیگراد نگهداری شود.

۴. از ذوب و انجماد مکرر نمونه‌ها اجتناب کنید. نمونه‌های 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، ویال‌ها را 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 معرف‌ها با نور مستقیم جلوگیری شود.

۴. در طی انجام مراحل استخراج یا آماده‌سازی مخلوط واکنش، دستکش‌های خود را بین هر مرحله مرتب تعویض کنید تا از ایجاد آلودگی‌های 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 زباله‌های عفونی این

تست به مانند دیگر عوامل بیماری‌زا می‌باشد.

۵. تمامی وسایل که در آزمایشگاه PCR مورد استفاده قرار می‌گیرند باید قبل و بعد از انجام تست با هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ و الکل ۷۰٪ ضد عفونی شوند و از جابه‌جایی این وسایل بین بخش‌های 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 می‌باشد 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.

آماده‌سازی معرف‌ها:

نکات مهم در انجام تست:

۱. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.

۲. معرف‌ها و نمونه‌ها 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 پروب‌ها 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، تیوب‌ها 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.

نکات مهم در انجام تست:

۱. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.

۲. معرف‌ها و نمونه‌ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.

۳. بهتر است کنترل‌ها و نمونه‌ها را به صورت دوتایی (Duplicate) آزمایش کنید و میانگین CT

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

مواد مورد نیاز برای هر تست	میزان مورد نیاز برای هر تست
مخلوط واکنش اوربون	۱۴ میکرولیتر
مخلوط آنزیمی	۱ میکرولیتر
الگو (کنترل منفی، RNA 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

MUMPS	تارگت ها
FAM	عوامل اوربون
ROX OR CY5	کنترل داخلی

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*	(FAM/CY5orROX)

* مرحله ای که خوانش انجام شود.

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

آماده سازی مخلوط واکنش Real-time RT-PCR

کیفی تک مرحله ای:

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 MUMPM و یک میکرولیتر از تیوب RT Enzyme به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.

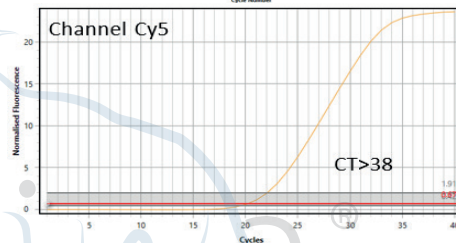
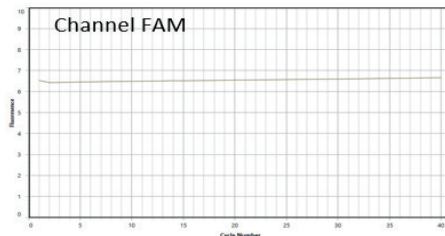
۴- ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل را به میکروتیوب NTC اضافه کنید.

محاسبه نتایج:

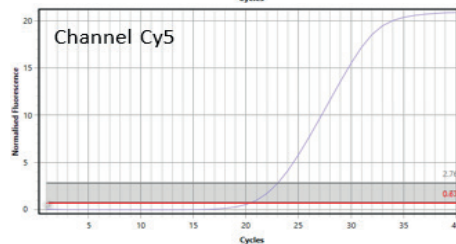
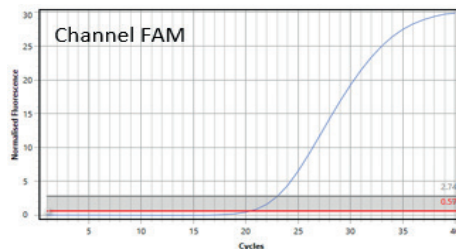
پس از اتمام واکنش، نتایج ذخیره شده را مطابق با جداول زیر آنالیز کنید.

تصویر ۱: نتایج تفسیری تیوب واکنش در کیت

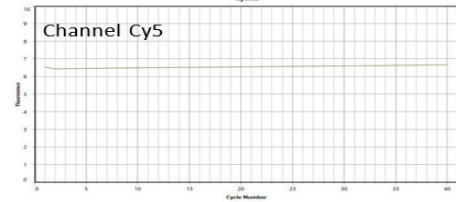
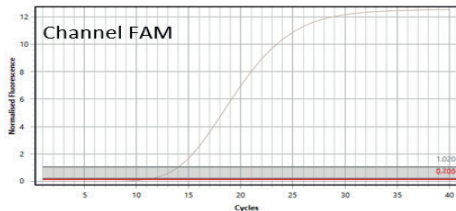
نتیجه	تفسیر	جواب
معتبر	MUMPS: اوریون	منفی



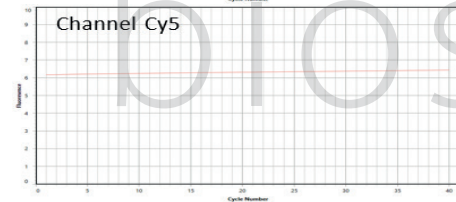
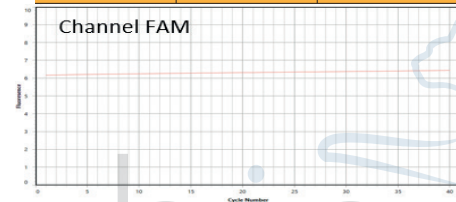
نتیجه	تفسیر	جواب
معتبر	MUMPS: اوریون	مثبت



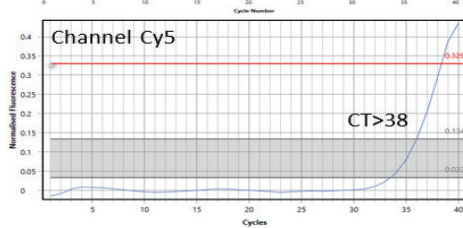
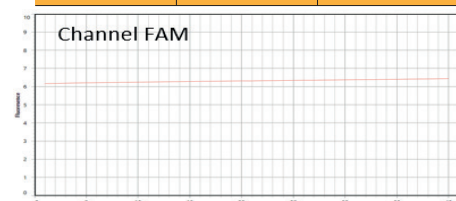
نتیجه	تفسیر	جواب
معتبر	MUMPS: اوریون	مثبت



نتیجه	تفسیر	جواب
نامعتبر	MUMPS: اوریون	تکرار استخراج



نتیجه	تفسیر	جواب
نامعتبر	MUMPS: اوریون	تکرار استخراج



جدول ۵: تفسیر نتایج کیت

فارها	مورد انتظار و معتبر	نتیجه و تفسیر
کنترل منفی	عدم حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی 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 سیگموئیدی در کانال FAM و Cy5 در CT کمتر از ۳۸	معتبر
کنترل مثبت	حضور منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM نشان دهنده اوربیون و منحنی تکثیر سیگموئیدی در کانال Cy5، نتیجه CT باید برای کانال سبز ۲۵-۲۷ و برای کانال قرمز ۲۵-۲۸ باشد.	معتبر
MUMPS	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و منحنی تکثیر در کانال Cy5 در CT کمتر از ۳۵	مثبت
MUMPS	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و عدم منحنی تکثیر در کانال Cy5 در CT کمتر از ۳۵	مثبت
MUMPS	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و منحنی تکثیر در کانال Cy5 در CT بالاتر از ۳۵	تکرار استخراج و در صورت تکرار همین نتیجه: مثبت
MUMPS	عدم تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و عدم منحنی تکثیر در کانال Cy5	تکرار استخراج و در صورت تکرار همین نتیجه: در کانال Cy5
MUMPS	عدم تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و منحنی تکثیر در کانال Cy5 در CT پایین تر از ۳۵	تکرار نمونه گیری
MUMPS	حضور تکثیر سیگموئیدی در کانال FAM و منحنی تکثیر در کانال Cy5 در CT پایین تر از ۳۵	مثبت

کنترل کیفی:

در هر کیت علاوه بر مسترمیکس دو میکروتیوب شامل کنترل منفی، مثبت وجود دارد که مشخصات هر یک بر روی پرچسب 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.

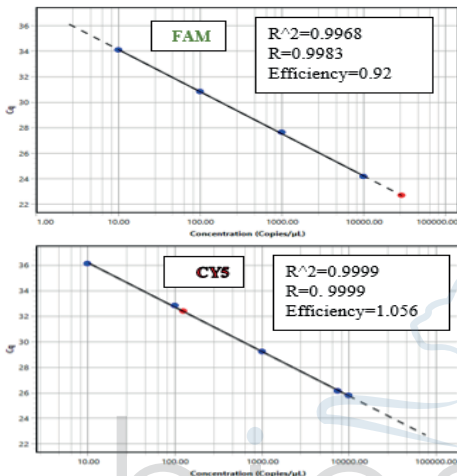
خصوصیات اجرایی کیت:

۱- حد پایینی اندازه گیری (Lower limit of measurement):
حد آشکار سازی (Limit-of-detection):
مطابق با راهنمای EP ۱۷-۲۲ مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) بدست

آمد. نهایتا LOD کیت جهت شناسایی اوربیون به روش Real-time PCR معادل ۳۸:CT 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 اوربیون به روش Real-time PCR فعلی و نمونه های تهیه شده از نمونه های بیمار مثبت RNA اوربیون در سه غلظت مختلف مطابق با راهنمای EP ۵-A^۳ 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 اوربیون به روش Real-time PCR فعلی می باشد.

۴- اختصاصیت (Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای EP ۷-A^۳ مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)، جهت تعیین واکنش متقاطع (cross reaction) کیت شناسایی اوربیون به روش Real-time PCR فعلی با سایر DNA و RNA ویروس ها واکنش متقاطع ندارد و اختصاصیت بالینی ۱۰۰ درصد است. همچنین تست

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.

روی ۸۳ نمونه مایع مغزی نخاعی انجام شد که نتایج غیراختصاصی حاصل نشد. همچنین ارزیابی درصد تداخل از ناحیه مداخله گرهای گلیول قرمز، گلوکز، لاکتات، آلبومین و لکوسیت انجام و مشخص گردید که تأثیری بر ردیابی RNA کیت شناسایی اوریون ندارد.

۵- حساسیت (Sensitivity):

ارزیابی حساسیت مطابق با راهنمای EP۰۷-A۳ مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)، جهت تعیین حساسیت بالینی کیت شناسایی اوریون به روش Real-time PCR فعلی در مقایسه با کیت مستقل دیگر روی ۱۱۶ نمونه بالینی مننژیت ویروسی انجام شد که میزان حساسیت بالینی ۱۰۰٪ با فاصله اطمینان (CI) ۹۵٪-۹۹٫۵٪ حاصل شد. همچنین ارزش اخباری منفی و مثبت کیت شناسایی اوریون به ترتیب ۱۰۰٪ با فاصله اطمینان (CI) ۹۵٪-۹۹٫۵٪ و ۱۰۰٪-۱۰۰٪ با فاصله اطمینان (CI) ۹۵٪-۹۹٫۵٪ می باشد.

۶- پدیده هوک:

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

منابع و مراجع:

1. 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

جدول نمادها:

REF	Catalog number	شماره رفرنس
LOT	Batch code	سری ساخت
IVD	In vitro diagnostic medical device	فرآورده تشخیصی و بالینی
SM	Data of manufacture	تاریخ تولید
🕒	Expiry date	تاریخ انقضا
🌡️	Temperature limitation	دمای نگهداری
📖	Read instructions befor use	مطالعه بروشور
⚠️	SufficiMUMPS for n tests	مختویات برای n تست کافیسیت
⚠️	Caution consult accompanying	توجه به مدارک همراه
🏢	documMUMPSs	آدرس شرکت
🏠	Manufacturer	در جای تاریک نگهداری شود