

محتویات کیت:

جدول ۱: معرف های کیت

معرف	برچسب	۲۴ تستی	۴۸ تستی	۹۶ تستی
مخلوط واکنش پنوموسیستیس کارینی	NOCM	۳۶۰ µl/Vial	۲ x ۳۶۰ µl/Vial	۴ x ۳۶۰ µl/Vial
کنترل منفی	Negative Control (NC)	۱۰۰ µl/Vial	۲ x ۱۰۰ µl/Vial	۴ x ۱۰۰ µl/Vial
کنترل مثبت	Positive Control (PC)	۱۰۰ µl/Vial	۲ x ۱۰۰ µl/Vial	۴ x ۱۰۰ µl/Vial

عنوان محصول:

کیت شناسایی کیفی پنوموسیستیس کارینی در نمونه های بالینی به روش Real time PCR

معرفی محصول:

پنومونی پنوموسیستیس کارینی التهاب ریه ها ناشی از یکتا تک یاخته (یک موجود میکروسکوپی تک سلولی). این تک یاخته موجودی فرصت طلب است که در شرایط طبیعی، بدن مانع تهاجم آن می گردد ولی در شرایط ضعف یا ناراسایی ایمنی مثلاً در جریان بیماری ایدز، هوجکین و سایر بیماری های تضعیف کننده دستگاه ایمنی به بدن تهاجم کرده و عفونت ایجاد می کنند تشخیص اختصاصی بر اساس شناسایی پنوموسیستیس جیرووسی در ترشحات برونکوپولموناری بدست آمده از خلط (Induced sputum) و لاولاژ برونکوالوئولار (BAL) می باشد. در مواقعی که این دو روش را نتوان استفاده نمود، انجام بیوپسی ترنس برونشال یا بیوپسی از ریه ی باز ضروری است. نتایج مثبت حاصل از انجام این PCR، تایید کننده ی وجود DNA ژنومی قارچ پنوموسیستیس است و نتایج منفی رد کننده عفونت PCP با این قارچ نیست و نتایج باید در ترکیب با یافته های بالینی، شرح حال بالینی بیمار و اطلاعات اپیدمیولوژیکی بکار گرفته شوند. لازم به ذکر است که نتایج مثبت حاصل از تست، رد کننده ی وجود سایر عفونت های باکتریایی و ویروسی همراه نمی باشد.

اساس آزمایش:

این کیت بر مبنای روش Real time PCR با استفاده از پروب برای شناسایی پنوموسیستیس کارینی مبتنی بر تکثیر قطعات DNA پنوموسیستیس کارینی 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 کیفیت 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 کالیبر Real-time PCR با حداقل ۳

کانال HEX/VIC/JOE (زرد)، ۶۷۰ Quasar/CY5 (قرمز) یا

نارنجی (ROX/Texas Red)

۲. موارد مصرفی شامل:

۱. کیت استخراج DNA

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 (HEX)، ۶۷۰ Quasar/CY5 (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

بهرتر 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: نمونه های تنفسی

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°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 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 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 و ویروس، نسبت به استخراج DNA قارچی، 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- ۱۴ میکرولیتر از PCPM 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 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 پنوموسیستیس کارینی	۱۵ میکرولیتر
الگو (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

تیوب های واکنش	پنوموسیستیس کارینی
JOE	پنوموسیستیس کارینی
ROX OR CY5	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*	(JOE/CY5orROX)

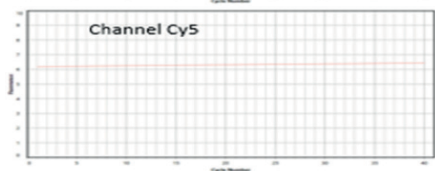
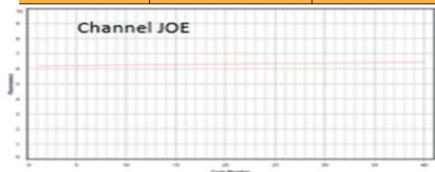
* مرحله ای که خوانش انجام شود.

محاسبه نتایج:

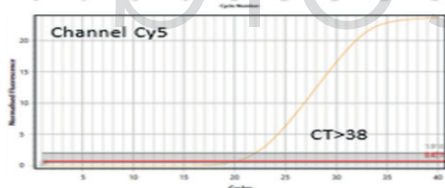
پس از اتمام واکنش، نتایج ذخیره شده را مطابق با جدول زیر آنالیز کنید.

تصویر ۱: نتایج تفسیری تیوب واکنش در کیت

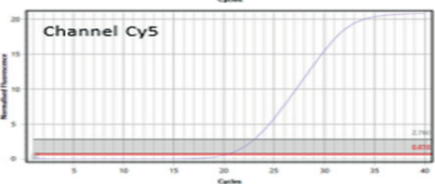
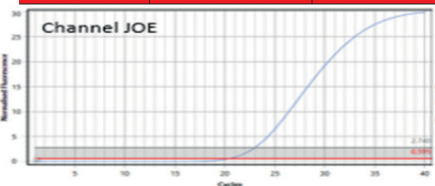
جواب	تفسیر	نتیجه
تکرار استخراج	پنوموسیستیس کارینی	نامعتبر



جواب	تفسیر	نتیجه
مثبت	پنوموسیستیس کارینی	معتبر



جواب	تفسیر	نتیجه
مثبت	پنوموسیستیس کارینی	معتبر



جدول ۵: تفسیر نتایج کیت

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

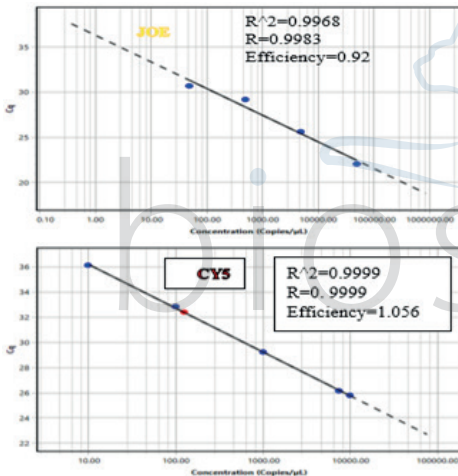
خصوصیات اجرایی کیت:

۱- حد پایینی اندازه گیری (Lower limit of measurement):

حد آشکار سازی (Limit-of-detection: LOD) مطابق با راهنمای A^۲-EPIV مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) بدست آمد. 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 پنوموسیستیس کارینی به روش Real-time PCR معادل ۳۷: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.



۳- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت جهت شناسایی پنوموسیستیس کارینی به روش Real-time PCR فعلی و نمونه های تهیه شده از نمونه های بیمار مثبت DNA پنوموسیستیس کارینی در سه غلظت مختلف مطابق با راهنمای A^۳-EP۰۵ مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) 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 پنوموسیستیس کارینی به روش Real-time PCR می باشد.

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.

۴- اختصاصیت (Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای EP۰۷-A^۲ مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)، جهت تعیین واکنش متقاطع (cross reaction) کیت شناسایی پنوموسیتیس کارینی به روش Real-time PCR فعلی با سایر DNA و 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 گریهای گلوکز، لاکتات، آلبومین و لکوسیت انجام و مشخص گردید که تأثیری بر ریدیابی DNA کیت شناسایی پنوموسیتیس کارینی ندارد.

۵- حساسیت (Sensitivity):

ارزیابی حساسیت مطابق با راهنمای EP۰۷-A^۲ مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)، جهت تعیین حساسیت بالینی کیت شناسایی پنوموسیتیس کارینی به روش Real-time PCR فعلی در مقایسه با کیت مستقل دیگر ۹۵ 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 پنوموسیتیس کارینی 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.

جدول نمادها:

REF	Catalog number	شماره رفرنس
LOT	Batch code	سری ساخت
IVD	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