

راهنمای کیت پیشرفته تشخیص مولکولی

HiTaq 17 Viro Respiratory pathogen One Step RT-PCR Kit

نام محصول: کیت تشخیص همزمان ۱۷ عامل ویروس تنفسی با روش TaqMan Real Time PCR

کد محصول: GA-17HiTaq-32

مورد استفاده

ویروس‌های Influenza H1N1, Influenza B, Influenza A+ SARS-CoV-2, HCoV-HKU1, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-229E, Metapneumovirus, RSV, Human Bocavirus 1,2,3, Parainfluenza 1,2,3, Adenovirus از جمله ویروس‌های RNA و DNA داری هستند که بطور معمول در بین مهره داران در گردش می‌باشند. این ویروس‌ها از عوامل مهم ایجاد سرماخوردگی، پنومونی و تنگی نفس در انسان هستند و با توجه به شیوع همزمان آنها در فصل‌های سرد سال تشخیص افتراقی این ویروس‌ها مورد نیاز است. این کیت با استفاده از روش TaqMan Real Time PCR قادر با تشخیص همزمان ۱۷ ویروس ذکر شده می‌باشد که نتایج این کیت می‌تواند به عنوان یک عامل کمک‌کننده برای تشخیص افتراقی عوامل بیماری زای تنفسی باشد.

نحوه عملکرد طراحی

مخلوط پرایمر، پروب و مسترمیکس واکنش این کیت در ۳ مخلوط واکنش جداگانه طراحی شده است که نواحی حفاظت شده در ویروس‌های SARS-CoV-2 (دو ناحیه ژنی) Influenza A, Influenza H1N1, Influenza B, HCoV-HKU1, HCoV-NL63, HCoV-229E, Metapneumovirus, RSV, Human Bocavirus 1,2,3, Parainfluenza 1,2,3, Adenovirus, HCoV-OC43 را بصورت همزمان شناسایی می‌کند و توسط محلول واکنش PCR مخلوط شده، تکثیر این الگوها را بصورت کیفی از طریق افزایش سیگنال فلورسانس توسط دستگاه Real Time PCR قابل اندازه‌گیری می‌کند. کنترل داخلی در این کیت شامل یک طراحی پرایمر و پروب اختصاصی برای RNA ژن RNase P بصورت اندوژن می‌باشد که علاوه بر بررسی مراحل نمونه برداری و استخراج الگو، کیفیت قابل قبول RNA استخراج شده را مشخص کرده تا مانع از گزارش نتایج منفی کاذب شود.

محتویات کیت

این کیت حاوی موارد مورد نیاز آزمایش One Step RT-PCR به فرمت ۳۲ تستی بوده که به شرح زیر می‌باشد

ردیف	مخلوط	مقادیر	تعداد
۱	HiTaq 17 Viro Mastermix 1	۲۲۰ میکرولیتر / ویال	۱ ویال ۲۲ تستی
۲	HiTaq 17 Viro Mastermix 2	۲۲۰ میکرولیتر / ویال	۱ ویال ۲۲ تستی
۳	HiTaq 17 Viro Mastermix 3	۲۲۰ میکرولیتر / ویال	۱ ویال ۲۲ تستی
۴	HiTaq 17 Viro Positive Control	۱۰۰ میکرولیتر / ویال	۱ ویال
۵	HiTaq 17 Viro Negative Control	۱۰۰ میکرولیتر / ویال	۱ ویال

شرایط نگهداری

- دمای نگهداری این کیت $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ بوده و مدت زمان استفاده از محتویات این کیت تا ۱ سال بعد از زمان تولید می‌باشد، تاریخ انقضاء کیت بر روی کیت درج شده است.
- از فریزر و دفریزر شدن محلول‌های موجود در کیت تا حد امکان خودداری کنید.

دستگاه‌های هماهنگ با کیت

این کیت قابلیت انجام در تمامی دستگاه‌های Real Time PCR با کانال‌های CY5, FAM, HEX, Texas Red (سبز، زرد، نارنجی و قرمز) را دارا می‌باشد.

مشخصات نمونه

- بهترین نوع نمونه مورد استفاده برای این تست به ترتیب نمونه لاواژ برانکئوآلوئولار، خلط، سواب بینی، بیوپسی برونکوسکوپی و سواب گلو می‌باشند.
- شرایط نمونه‌گیری: جمع‌آوری نمونه براساس پروتکل استاندارد مطابق با نوع نمونه انجام شود.

۳. نگهداری و انتقال نمونه: نمونه‌های جمع‌آوری شده بلافاصله برای انجام آزمایش قابل استفاده هستند که باید در زمان ارسال به آزمایشگاه در محفظه‌ی بسته و در مجاورت یخ انتقال انجام شود. همچنین نگهداری نمونه در دمای 4°C برای ۲ روز، دمای 20°C - برای ۳ ماه و دمای 70°C - برای مدت طولانی تر قابل انجام است. همچنین تا حد امکان از فریزر و دفریز کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده سازی الگو پیش از آزمایش

الگو مورد نیاز برای انجام این تست، RNA و DNA ویروسی بوده که می‌توان طبق پروتکل استاندارد کیت‌های معتبر استخراج مانند Qiagen Qiamap MinElute virus spin Kit و High Pure Viral Nucleic Acid Roche عمل کرد. RNA و DNA استخراج شده بصورت مستقیم قابل استفاده برای انجام آزمایش می‌باشد و در غیر اینصورت الگو استخراج شده را در دمای 70°C - درجه نگه‌داری کنید همچنین تا حد امکان از فریزر و دفریز کردن مکرر نمونه RNA خودداری کنید.

آماده سازی مخلوط واکنش

۱. محتویات کیت را از داخل جعبه آن خارج کنید و اجازه دهید تا به دمای اتاق رسیده و بصورت کامل مایع شوند. پس از رسیدن محلول‌ها به دمای اتاق، ابتدا چند ثانیه تیوب‌ها را اسپین کنید و سپس طبق جدول زیر عمل کرده و هر تیوب واکنش را آماده کنید.

میزان مورد نیاز برای هر تست	مواد مورد نیاز برای هر تست
۱۰ میکرولیتر در تیوب ۱	HiTaq 17 viro Mastermix 1 (FAM, HEX, Texas Red, CY5)
۱۰ میکرولیتر در تیوب ۲	HiTaq 17 viro Mastermix 2 (FAM, HEX, Texas Red, CY5)
۱۰ میکرولیتر در تیوب ۳	HiTaq 17 viro Mastermix 3 (FAM, HEX, Texas Red, CY5)
۱۰ میکرولیتر	الگو استخراج شده، کنترل منفی یا کنترل مثبت
۳۰ میکرولیتر	حجم نهایی واکنش

۲. با توجه به تعداد نمونه‌های مورد آزمایش و تعداد کنترل‌های مثبت و منفی، مقدار تعیین شده از محلول‌ها را آماده کنید.

اضافه کردن الگو به مخلوط واکنش

- پس از آماده سازی محلول‌ها، مخلوط‌های حاصل را به منطقه تمیز انجام آزمایش منتقل کنید.
- تیوب‌های نمونه‌های نامشخص: به هر کدام از تیوب‌های واکنش مورد سنجش، ۱۰ میکرولیتر الگو اضافه کنید.
- تیوب کنترل منفی: به هر کدام از تیوب‌های واکنش کنترل منفی، ۱۰ میکرولیتر از کنترل منفی یا آب عاری از نوکلئاز اضافه کنید.
- سپس درب تیوب‌ها موارد ۲ و ۳ را بسته و اسپین کنید (در صورت استفاده از دستگاه‌های Real Time PCR دارای روتور چرخان نیازی به اسپین کردن تیوب‌ها نمی‌باشد).
- تیوب کنترل مثبت: در یک فضای دیگر و دور از محوطه آماده‌سازی سایر مخلوط‌های واکنش به تیوب واکنش کنترل مثبت، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط کنترل مثبت موجود در کیت اضافه کنید.

انجام واکنش Real Time PCR

- نام‌گذاری نمونه‌ها:
- تیوب‌ها را داخل دستگاه Real Time PCR قرار داده و بعد از آن هر کدام از واکنش‌ها (نمونه مجهول، کنترل مثبت و کنترل) را نام‌گذاری کنید.
- انتخاب کانال سنجش:
- تیوب ۱: کانال‌های Fam (ویروس SARS-CoV-2)، کانال HEX (ژن RNase P به عنوان کنترل داخلی)، کانال Texas Red (ویروس آنفلوانزا A) و کانال CY5 (ویروس آنفلوانزا B) را انتخاب کنید.
- تیوب ۲: کانال‌های Fam (ویروس Influenza H1N1)، کانال HEX (ویروس‌های HCoV-NL63 و HCoV-229-E)، کانال Texas Red (متاپنوموویروس) و کانال CY5 (ویروس RSV) را انتخاب کنید.
- تیوب ۳: کانال‌های Fam (ویروس‌های OC-43 و HKU1)، کانال HEX (ویروس‌های پارآنفلوانزا ۱، ۲ و ۳)، کانال Texas Red (بوکا ویروس ۱، ۲ و ۳) و کانال CY5 (آدنو ویروس) را انتخاب کنید.
- نکته: در صورت استفاده از دستگاه‌های شرکت ABI (Applied Biosystems) و دستگاه‌های مشابه نیازمند رنگ رفرنس، لطفاً گزینه رنگ رفرنس پس زمینه (Passive reference dye) را بر روی تنظیمات none قرار دهید.

۳. برنامه دمایی و زمانی واکنش مورد نظر مطابق با شرایط جدول زیر می باشد:

برنامه دمایی و زمانی استاندارد کیت HiTeq 17 Viro Respiratory pathogen OneStep RT-PCR				
ترتیب واکنش	مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
۱	cDNA synthesis	۵۰°C	۱۵ دقیقه	۱
۲	Holding	۹۵°C	۳ دقیقه	۱
۳	Denaturation	۹۴°C	۵ ثانیه	۴۶ سیکل
۴	annealing, Extension and fluorescence measurement	۶۰°C	۳۰ ثانیه	

• پس از ایجاد برنامه و تنظیمات جدید، فایل مورد نظر را ذخیره و شروع انجام واکنش را راه اندازی کنید.

تحلیل نتایج

• پس از انجام و خاتمه واکنش، نتایج ذخیره شده را مطابق با جدول زیر آنالیز کنید:

مراحل	حالت مورد نظر	رد یا قبول بودن واکنش
۱. مرحله اول بررسی کنترل منفی	مرحله اول بررسی کنترل منفی	قبول - عدم آلودگی مخلوط واکنش
	داشتن سیگنال سیگموتیدی Cq بالاتر از ۴۰ در هر کدام از کانالها	قبول با یک شرط - در این حالت تنها نمونه های بیمار دارای Cq با فاصله حداقلی ۶ سیکل از آلودگی در کانال مربوطه را می توان به عنوان نمونه های دارای ژنوم ویروس مورد قبول دانست.
	داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq بالاتر از ۲۵ در هر کدام از کانالها	قبول با یک شرط - در این حالت تنها نمونه های دارای Cq با فاصله حداقلی ۶ سیکل از آلودگی در کانال مربوطه را می توان به عنوان نمونه های دارای ژنوم ویروس مورد قبول می باشد
	داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۲۵ در هر کدام از کانالها	رد واکنش و تکرار دوباره واکنش بعد از حذف آلودگی - هر کدام از کانالها با داشتن آلودگی Cq کمتر از ۲۵ قابل تفسیر نمی باشند.
۲. مرحله دوم بررسی نمونه بیمار	داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۲۵ در کانال سبز و زرد	قبول - عملکرد صحیح پرایمر و پروپ، مخلوط واکنش و عدم تخریب کنترل مثبت یا دیگر اعضاء واکنش که نشان از نگهداری صحیح آن دارد.
	داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq بالاتر از ۲۵ در هر کدام از کانالهای سبز و زرد	رد واکنش - تخریب کنترل مثبت یا یکی دیگر از اعضاء واکنش که نشان از عدم نگهداری صحیح آن دارد. در صورت مثبت بودن نمونه های تحت بررسی می توانی از این عیب صرف نظر کنید.
	تیوب ۱	کانال HEX: به عنوان کانال شناسایی RNase P بررسی شود که باید دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰ باشد. مثبت بودن این کانال نشان از استخراج صحیح اسید نوکلئیک و انجام سنتز cDNA کافی می باشد.
	تیوب ۲	کانال FAM: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود ویروس SARS-CoV-2 مثبت می باشد.
تیوب ۳	کانال Texas Red	کانال Texas Red: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود ویروس Influenza A مثبت می باشد.
	کانال CY5	کانال CY5: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود ویروس Influenza B مثبت می باشد.
	کانال FAM	کانال FAM: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود ویروس Influenza H1N1 مثبت می باشد.
	کانال HEX	کانال HEX: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود ویروس HCoV-229-E و HCoV-NL63 بصورت تکی یا همزمان مثبت می باشد.
تیوب ۳	کانال Texas Red	کانال Texas Red: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود ویروس متاپنوموویروس مثبت می باشد.
	کانال CY5	کانال CY5: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود ویروس RSV مثبت می باشد.
	کانال FAM	کانال FAM: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود ویروس های OC-43 و HKU1 بصورت تکی یا همزمان مثبت می باشد.
	کانال HEX	کانال HEX: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود ویروس پارا آنفلوآنزا ۲ و ۱ بصورت تکی یا همزمان مثبت می باشد.
تیوب ۳	کانال Texas Red	کانال Texas Red: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود بوکاو ویروس مثبت می باشد.
	کانال CY5	کانال CY5: در صورت داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰، نمونه از نظر وجود آدنو ویروس مثبت می باشد.

حد آستانه مثبت

با توجه به مطالعه مقدار مرجع، Cq مرجع برای ژن های مورد نظر تا مقدار ۴۰ با داشتن شرایط ذکر شده قابل قبول است.

محدودیت های روش تشخیص

- زمان نمونه گیری و انجام نمونه گیری نامناسب، انتقال نادرست، پردازش نامناسب نمونه، شرایط بد نگهداری کیت، عدم صحیح انجام واکنش توسط کاربر می تواند باعث ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.
- آلودگی نمونه به بعضی مواد یا داروهای خاص و یا آلودگی در حین پردازش نمونه می تواند باعث

ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.

۳. امکان ایجاد جهش و تغییرات توالی هدف در ویروس های هدف می تواند یکی از دلایل ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.

۴. آزمایش باید طبق پروتکل سازنده کیت و در شرایط Good Laboratory Practice باید انجام شود.

عملکرد محصول

۱. اختصاصیت تست: طراحی انجام شده برای توالی ژن های هدف در ویروس های مورد نظر بصورت اختصاصی بوده و هیچ واکنش متقاطعی با عوامل MERS-CoV, Human Rhinovirus A, Enterovirus, Herpes Simplex virus, Varicella-zoster virus, Epstein Barr virus, Measles, Mumps, Cytomegalovirus, Bordetella pertussis, Candida albicans, Chlamydia pneumonia, Corynebacterium diphtheria, Escherichia coli, Streptococcus pyogenes, Haemophilus influenza, Lactobacillus plantarum, Legionella pneumophila, Moraxella catarrhalis, Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma pneumonia, Neisseria elongate, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumonia, Streptococcus salivarius از خود نشان نداده است.

• Analytical Specificity کیت موجود ۱۰۰ درصد و Diagnostic Specificity

نیز ۹۵ درصد می باشد.

Analytical Sensitivity کیت (LoD) برای SARS-CoV-2 برابر با ۱۰۰ کپی در هر میلی لیتر، برای Influenza A برابر با ۲۰۰ کپی در هر میلی لیتر، برای Influenza B برابر با ۲۵۰ کپی در هر میلی لیتر و برای RSV برابر با ۳۰۰ کپی در هر میلی لیتر، برای ویروس متاپنوموویروس ۳۰۰ کپی در هر میلی لیتر، برای پارا آنفلوآنزا ۵۰۰ کپی در هر میلی لیتر، برای ویروس 229-E ۲۵۰ NL63 کپی در هر میلی لیتر، برای ویروس OC-43 ۳۵۰ کپی در هر میلی لیتر، برای ویروس HKU1 ۳۰۰ کپی در هر میلی لیتر، برای بوکا ویروس و آدنو ویروس ۵۰۰ کپی در هر میلی لیتر است. همچنین Sensitivity Diagnostic کیت بالاتر از ۹۵ درصد می باشد. همچنین رنج دینامیک و رنج خطی کیت موجود برابر با 10^1 تا 10^9 می باشد.

خطرات و پیشگیری

- لطفا پیش از استفاده راهنمای کیت را با دقت مطالعه کنید. پرسنل آزمایشگاه باید آموزش دیده و آشنایی کامل با روند و خطرات دستگاه ها را داشته باشند. تمام وسایل و امکانات باید پیش از استفاده استریل بوده و این وسایل جابه جایی بین بخش های مختلف PCR در آن دیده نشود. در واقع هر بخش باید وسایل و مواد مختص به خود را داشته باشد.
- این کیت تنها قابلیت استفاده در شرایط آزمایشگاهی را دارد و کاربرد دیگری برای آن متصور نیست. همچنین کنترل کیفی برای هر آزمایش انجام شود.
- مدیریت آزمایشگاه طبق دستورالعمل های آزمایشگاه های مولکولی انجام گیرد. تمام نمونه ها باید به صورت بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند و باید در یک فضا یا هود با کلاس ایمنی زیستی سطح II نمونه مورد پردازش قرار گیرد. پرسنل تمامی تمهیدات لازم مانند تجهیزات حفاظت شخصی (PPE) که شامل استفاده از دستکش های یکبار مصرف، عینک، گان یا روپوش آزمایشگاهی می شود را رعایت کند.
- پرسنل در طی انجام مراحل استخراج یا آماده سازی مخلوط واکنش، دستکش های خود را بین هر مرحله باید مرتب تعویض کند تا از ایجاد آلودگی های کاذب کننده در روند آزمایش جلوگیری کند. مراحل کار باید طبق شرایط استاندارد آزمایشگاه در پیشگیری از ایجاد آلودگی و عفونت انجام گیرد. همچنین شرایط دفع زباله های عفونی این تست به مانند دیگر عوامل بیماری زای تنفسی می باشد.

mabnaGene
مینا ژن پارس

مشاوره راه اندازی، تجهیز و تامین کلیه اقلام بخش مولکولی

تهران، اشرفی اصفهانی، جنب درمانگاه بهراد، ساختمان شماره ۵۴، طبقه دوم واحد ۴، تلفکس: ۴۴۰۰۱۵۸-۹

