

## راهنمای کیت مولکولی نسل جدید

## GA Arbo Encephalitis OneStep RT-PCR

نام محصول: GA Arbo Encephalitis OneStep RT-PCR Kit

کدمحصول: GA-ArboEnceph.100

## معرفی

ویروس های نیل غربی (West Nile Virus)، ویروس اسفالیبت کنه ای (Tike Born Encephalitis)، ویروس Usutu و زیکا ویروس از خانواده فلاوی ویریده جنس فلاوی ویروس می باشند که دارای ژنوم RNA تک رشته سانس مثبت می باشند که جزو عوامل آربو ویروس عصبی بیماری های گرمسیری منتقله از طریق حشرات طبقه بندی میگردند. این کیت (GA Arbo encephalitis OneStep RT-PCR) قادر به تشخیص کیفی ویروس های نامبرده به طور همزمان به روش TaqMan Real Time PCR در یک مرحله می باشد و از داده های این کیت میتوان به عنوان یک عامل کمک کننده در تشخیص استفاده کرد.

## اساس تست

مخلوط پرایمر و پروب این کیت به صورت Triple target gene بوده که نواحی حفاظت شده از آربو ویروس های نیل غربی، TBE، Usutu و زیکا را شناسایی کرده که در صورت شناسایی توسط مخلوط واکنش موجود در کیت این نواحی تکثیر شده و آزادسازی سیگنال فلورسانس ایجاد شده توسط دستگاه Real Time PCR سنجش می شود. کنترل داخلی در این کیت شامل یک طراحی پرایمر و پروب اختصاصی برای RNA ژن RNase P به صورت اندوژن می باشد که علاوه بر بررسی مراحل نمونه برداری، انتقال نمونه و استخراج الگو، کیفیت قابل قبول RNA استخراج شده را مشخص کرده تا مانع از نتایج منفی کاذب شود.

## محتویات کیت

این کیت حاوی موارد مورد نیاز آزمایش به فرمت ۵۰ تستی بوده که به شرح زیر می باشد:

ردیف	مخلول	مقادیر	تعداد
۱	Arbo Encephalitis MasterMix	۲۵۰ میکرولیتر در هر ویال	۲ ویال ۲۵ تستی
۲	Arbo Positive Control	۱۰۰ میکرولیتر در هر ویال	۱ ویال
۳	Arbo Negative Control	۱۰۰ میکرولیتر در هر ویال	۱ ویال

## شرایط نگهداری

- دمای نگهداری این کیت  $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$  می باشد.
- از فریز و دفریز شدن محلول های موجود در کیت تا حد امکان خودداری کنید.
- مدت زمان استفاده از محتویات این کیت تا ۱ سال بعد از زمان تولید می باشد، تاریخ انقضاء کیت بر روی کیت درج شده است.

## دستگاه های هماهنگ با کیت

این کیت قابلیت انجام در تمامی دستگاه های Real Time PCR دارای کانال های TEXAS RED، FAM، HEX و CY5 (سبز، زرد، نارنجی و قرمز) را دارد.

## مشخصات نمونه

- نمونه مورد استفاده در این کیت به منظور شناسایی آربو ویروس های عصبی نیل غربی، TBE USUTO، زیکا به طور معمول استفاده از سرم یا پلاسما می باشد.
- شرایط نمونه گیری: جمع آوری نمونه بر اساس پروتکل استاندارد مطابق با نوع نمونه انجام شود.
- نگهداری و انتقال نمونه: نمونه های جمع آوری شده بلافاصله برای انجام آزمایش قابل استفاده هستند که باید در زمان ارسال به آزمایشگاه در محفظه بسته و در مجاورت یخ انتقال انجام شود. همچنین نگهداری نمونه در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  برای ۲ روز، دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - برای ۳ ماه و دمای  $70^{\circ}\text{C}$  - برای مدت طولانی تری قابل انجام است. تا حد امکان از فریز و دفریز کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

## آماده سازی الگو پیش از آزمایش

الگوی مورد نیاز برای انجام این تست RNA ویروسی بوده که می توان طبق پروتکل استاندارد کیت های معتبر استخراج ژنوم ویروسی مانند Qiagen QIAamp DSP Viral RNA و High Pure Viral Nucleic Acid Roche و دیگر کیت های استخراج ژنوم ویروسی معتبر

عمل کرد RNA استخراج شده بصورت مستقیم قابل استفاده برای انجام آزمایش می باشد و در غیر این صورت RNA استخراج شده را در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  - نگهداری کنید. همچنین تا حد امکان از فریز و دفریز کردن مکرر نمونه RNA خودداری کنید.

## آماده سازی مخلوط واکنش

محتویات کیت را از داخل جعبه آن خارج کنید و اجازه دهید تا به دمای اتاق رسیده و کامل بصورت مایع درآیند. پس از رسیدن محلول ها به دمای اتاق، چند ثانیه ویال ها را اسپین کنید و سپس طبق موارد زیر عمل کرده و هر مخلوط واکنش را آماده کنید:

۱. ابتدا به هر کدام از تیوب های واکنش ۱۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش ArboEncephalitis MasterMix (حاوی مواد مورد نیاز واکنش و پرایمر و پروب) را اضافه کنید.

## اضافه کردن الگو (RNA) به مخلوط واکنش

پس از آماده سازی مخلوط واکنش، مخلوط های حاصل را به منطقه تمیز انجام آزمایش منتقل کنید.

★ تیوب های نمونه های مجهول: به هر کدام از تیوب های واکنش مورد سنجش، ۱۰ میکرولیتر الگو RNA اضافه کنید.

★ تیوب کنترل منفی: به هر کدام از تیوب های واکنش کنترل منفی، ۱۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز اضافه کنید.

★ سپس درب تیوب های موارد ۲ را بسته و اسپین کنید (در صورت استفاده از دستگاه های Rael Time PCR دارای روتور چرخان نیازی به اسپین کردن تیوب هانمی باشد).

★ تیوب کنترل مثبت: در یک فضای دیگر و دور از محوطه آماده سازی سایر مخلوط های واکنش به تیوب واکنش کنترل مثبت، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط کنترل مثبت موجود در کیت اضافه کنید.

میزان مورد نیاز برای هر تست	مواد مورد نیاز برای هر تست
۱۰ میکرولیتر	مخلوط واکنش (ArboEncephalitis MasterMix) حاوی مواد مورد نیاز برای انجام واکنش و پرایمر و پروب
۱۰ میکرولیتر	الگو (RNA، کنترل منفی یا کنترل مثبت)
۲۰ میکرولیتر	حجم نهایی واکنش

## انجام واکنش Real Time PCR

۱. نام گذاری نمونه ها:

تیوب ها را داخل دستگاه Real Time PCR قرار داده و بعد از آن هر کدام از تیوب ها (نمونه های مجهول، کنترل مثبت و کنترل منفی) را نام گذاری کنید.

۲. انتخاب کانال سنجش:

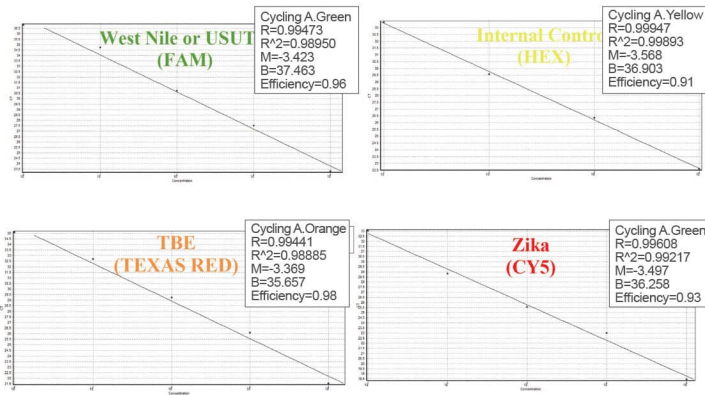
کانال سبز یا FAM را برای تشخیص ویروس نیل غربی و Usutu، کانال زرد یا HEX برای تشخیص ژن RNase P به عنوان کنترل داخلی، کانال نارنجی یا TEXAS RED برای تشخیص ویروس TBE و کانال قرمز یا CY5 برای تشخیص ویروس زیکا را در دستگاه Real Time PCR انتخاب کنید.

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

برنامه دمایی و زمانی استاندارد کیت GA Arbo encephalitis OneStep RT-PCR			
ترتیب واکنش	مرحله	دما	زمان
۱	Reverse Transcription	$53^{\circ}\text{C}$	۱۵ دقیقه
۲	Holding	$95^{\circ}\text{C}$	۳ دقیقه
۳	Denaturation	$94^{\circ}\text{C}$	۵ ثانیه
		$60^{\circ}\text{C}$	۳۰ ثانیه
۴	PCR cycling	Annealing, Extension and fluorescence measurement	۴۶ سیکل

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

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



منحنی استاندارد آریو ویروسهای West Nile، Usutu، RNase p، TBE و زیکا در کانال های سبز، زرد، نارنجی و قرمز

کمترین حد تشخیص (LOD) برای آریو ویروسهای نیل غربی، Usutu، TBE و زیکا کمترین حد تشخیص (LOD) ۵۰ کپی در هر واکنش می باشد که دارای حساسیت بالای ۹۵ درصد در تکرار ۲۰ تایی با حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر است. رنج دینامیک و رنج خطی کیت موجود برابر با ۱۰<sup>۱</sup> تا ۱۰<sup>۹</sup> می باشد. عرض از مبدا واکنش (میزان Cq قابل قبول در کمترین کپی) در سیکل ۴۰ بوده و ضریب همبستگی واکنش (r<sup>2</sup>) یا میزان تطابق با منحنی استاندارد در حدود ۰.۹۹ درصد می باشد. همچنین بازده واکنش در ۴ ژن برابر با ۹۱ تا ۹۸ درصد است.

### 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. به همراه این کیت، لوازم نمونه گیری، نگهداری نمونه و استخراج ژنوم وجود ندارد و در زمان انجام تست توصیه می شود از تیپ های فیلتردار استفاده شود.
- 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. به همراه این کیت لوازم نمونه گیری، نگهداری نمونه، استخراج ژنوم، سرسمپلر و لوازم محافظتی شخصی مورد نیاز وجود ندارد که لازم است قبل از استفاده تهیه شود.
- 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 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 زا می باشد.
- شرایط نگهداری این کیت به مدت ۷ روز در دمای یخچال یا در پک های یخی می باشد که برای نگهداری طولانی مدت و حفظ نیمه عمر محصول آن را در دمای ۲۰ C<sup>+</sup> قرار دهید.

مرحله	حالت مورد نظر	رد یا قبول بودن واکنش
۱. بدون واکنش	بدون گراف تکثیر یا سینگنال سیگمونی با میزان فلورسنس غیر قابل قبول در هر کدام از کانال ها	قبول - عدم آلودگی مخلوط واکنش
	داشتن سینگنال سیگمونی و Cq بالاتر از ۴۰ در هر کدام از کانال ها	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.
۲. واکنش مثبت	داشتن سینگنال سیگمونی و Cq بالاتر از ۲۵ در هر کدام از کانال ها	قبول با 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 باشند
	داشتن سینگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۲۵ در هر کدام از کانال ها	رد واکنش و تکرار دوباره واکنش بعد از حذف آلودگی - هر کدام از کانال ها با داشتن آلودگی Cq کمتر از ۲۵ قابل تفسیر نمی باشند.
۳. واکنش مثبت	داشتن سینگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۲۵ در همه کانال ها	قبول - عملکرد صحیح پرایمر و پروب، مخلوط واکنش و عدم تخریب کنترل مثبت یا دیگر اجزای واکنش که نشان از نگهداری صحیح آن دارد.
	داشتن سینگنال سیگمونی و Cq بالاتر از ۲۵ در هر کدام از کانال ها	رد واکنش - تخریب کنترل مثبت یا یکی دیگر از اجزای واکنش که نشان از عدم نگهداری صحیح آن دارد. در صورت مثبت بودن نمونه های تحت بررسی می توانید از این عیب صرف نظر کنید.
۴. واکنش مثبت	۱. کانال FAM دارای سینگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۴۰ می باشد.	قبول واکنش و نتیجه وجود آریو ویروس نیل غربی یا Usutu مثبت می باشد.
	۲. تنها کانال HEX دارای سینگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۲۵ می باشد.	قبول واکنش - استخراج RNA و انجام واکنش سنتز cDNA به درستی انجام گرفته است و واکنش از نظر وجود آریو ویروسهای نیل غربی، Usutu، TBE زیکا منفی می باشد.
	۳. کانال Texas Red دارای سینگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۴۰ می باشد.	قبول واکنش و نتیجه مثبت از نظر وجود آریو ویروس TBE مثبت می باشد.
	۴. کانال CY5 دارای سینگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۴۰ می باشد.	قبول واکنش و نتیجه از نظر وجود آریو ویروس زیکا 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.
- امکان ایجاد جهش و تغییرات توالی هدف در آریو ویروسهای عصبی نیل غربی، Usutu، TBE و زیکا می تواند یکی از دلایل ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.
- آزمایش باید طبق پروتکل سازنده کیت و در شرایط Good Laboratory Practice انجام شود.

### عملکرد و ارزیابی محصول

پرایمر و پروب های این کیت براساس توالی ژنی اختصاصی آریو ویروسهای عصبی نیل غربی، Usutu، TBE و زیکا طراحی شده است. همچنین طراحی انجام شده هیچ واکنش متقاطعی با دیگر توالی های ژنومی انسانی، ویروسی و باکتریایی در تست in silico از خود نشان نداده است.

### جدول نمونه ارزیابی بالینی کیت GA Arbo Encephalitis OneStep RT-PCR

نمونه ویروس	نتیجه با کیت تجاری کمپانی X تشخیص آریو ویروسهای عصبی نیل غربی TBE، Usutu و زیکا به روش Onestep RT-PCR	نتیجه با کیت GA Arbo Encephalitis OneStep RT-PCR
نمونه منفی از نظر آریو ویروسهای عصبی نیل غربی، Usutu و زیکا	۳۰	۳۰
نمونه مثبت از نظر آریو ویروسهای عصبی نیل غربی، Usutu و زیکا	۵	۵



Do not use after the year, month and date mentioned  
Upper limit of temperature  
Read Instructions before Use  
in vitro diagnostic

Manufacturer  
Keep away from sunlight  
Catalog number  
Sufficient for

Do not re-use  
Temperature limit  
Batch code  
Manufacturing date