

## راهنمای کیت مولکولی نسل جدید تشخیص

## GA Arbo Hemorrhagic OneStep RT-PCR

نام محصول: GA Arbo Hemorrhagic OneStep RT-PCR Kit

کدمحصول: GA-ArboHemo.100

## معرفی

ویروسهای تب کریمه کنگو (CCHF) از خانواده نایروویریده، جنس اورتوناویروویروس دارای ژنوم RNA حلقوی سنس منفی، تب دنگ (DENGUE) از خانواده فلاوی ویریده دارای ژنوم RNA تک رشته سنس منفی، Severe fever with thrombocytopenia virus syndrome (SFTSV) از خانواده فتوئیروویریده جنس بانداویروس و تب دره ریفت (RVFV) از خانواده فتوئی ویریده جنس فلیوویروس دارای ژنوم RNA قطعه قطعه تک رشته سنس منفی، جزو عوامل ویروسی تبهای خونریزی دهنده ناقل از بندپایان و حشرات طبقه بندی میگردند. این کیت (GA Arbo Hemorrhagic OneStep RT-PCR) قادر به تشخیص کیفی ویروسهای نامبرده به طور همزمان به روش TaqMan Real Time PCR در یک مرحله انجام دهد و از دادههای این کیت میتوان به عنوان یک عامل کمک کننده در تشخیص استفاده کرد.

## اساس تست

مخلوط پرایمر و پروب این کیت به صورت Quadruple target gene بوده که نواحی حفاظت شده از ویروس تب کریمه کنگو، تب دنگ، SFTSV، و تب دره ریفت 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 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	مخلوط	مقادیر	تعداد
۱	ArboHemo 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 محلولهای 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 بروی کیت درج شده است.

## دستگاههای هماهنگ با کیت

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

## مشخصات نمونه

- نمونه مورد استفاده در این کیت به منظور شناسایی ویروسهای تب خونریزی دهنده: تب کریمه کنگو، تب دنگ، SFTV و تب دره ریفت 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 اینصورت 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 تیوب واکنش را آماده کنید:

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

## اضافه کردن الگو (RNA) به مخلوط واکنش

۲. 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 ها نمی 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 (ArboHemo 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:

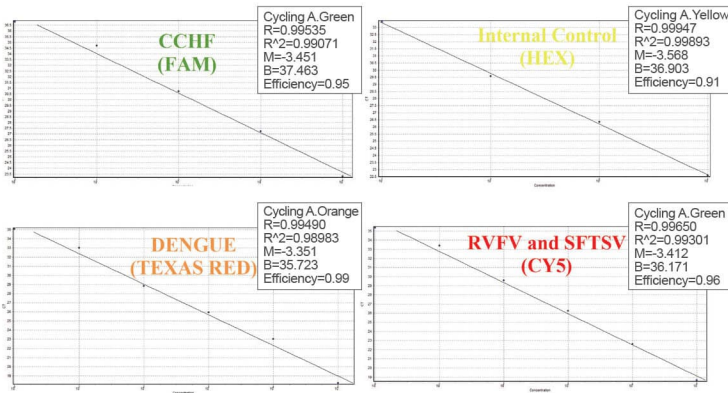
کانال سبز یا FAM برای تشخیص تب کریمه کنگو، کانال زرد یا HEX برای تشخیص ژن RNase P به عنوان کنترل داخلی، کانال نارنجی یا TEXAS RED برای تشخیص تب دنگ و کانال قرمز یا CY5 برای تشخیص ویروس تب دره ریفت و SFTSV را در دستگاه Real Time PCR انتخاب کنید.

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

برنامه دمایی و زمانی استاندارد کیت GA Arbo Hemorrhagic OneStep RT-PCR			
ترتیب واکنش	مرحله	دما	زمان
۱	Reverse Transcription	$52^{\circ}\text{C}$	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 CCHF + DENGUE + RFLV + RSTSV در کانال های سبز ، زرد ، نارنجی ، قرمز

کمترین حد تشخیص (LOD) برای ژنهای مختلف برابر ۱۰۰ 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 کانال برابر با ۹۱ تا ۹۹ 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 کنند تا از ایجاد آلودگی کاذب کننده در روند آزمایش جلوگیری کنند. 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- قرار دهید.

مراحل	حالت مورد نظر	رد یا قبول بودن واکنش
۱. بدون ژنوم ویروسی	بدون سیگنال سیگنال سیکمونی با میزان فلورسنس غیر قابل قبول در هر کدام از کانال ها	قبول- عدم آلودگی مخلوط واکنش
	داشتن سیگنال سیگمونی و Cq بالاتر از ۴۰ در هر کدام از کانال ها	قبول با یک شرط- در این حالت تنها نمونه های بیمارانی 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. ژنوم ویروسی	داشتن سیگنال 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 سیگنال 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. ژنوم ویروسی غیر قابل تشخیص	داشتن سیگنال 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 سیگنال 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.
	۱. کانال FAM دارای سیگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۴۰ می باشد.	قبول واکنش و نتیجه وجود ویروس تب کریمه کنگو مثبت می باشد.
	۲. تنها کانال HEX دارای سیگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۴۰ می باشد.	قبول واکنش- استخراج RNA و انجام واکنش سنتز cDNA به درستی انجام گرفته است و واکنش از نظر وجود ویروس منفی می باشد.
۳. ژنوم ویروسی غیر قابل تشخیص	۳. کانال Texas Red دارای سیگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۴۰ می باشد.	قبول واکنش و نتیجه وجود ویروس تب دنگ مثبت می باشد.
	۴. کانال CY5 دارای سیگنال سیگمونی و Cq کمتر از ۴۰ می باشد.	قبول واکنش و نتیجه وجود ویروس تب دره ریفت یا SFTSV مثبت می باشد.

### حد آستانه مثبت

با توجه به مطالعه مقدار مرجع، Cq مرجع برای ژن های مورد نظر تا مقدار ۴۰ 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 ویروس های تب کریمه کنگو، تب دنگ، SFTSV و تب دره ریفت 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 طراحی شده است. همچنین طراحی انجام شده هیچ واکنش متقاطع 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 Hemorrhagic OneStep RT-PCR		
نمونه ویروس	نتیجه با کیت تجاری کمپانی X تشخیص ویروس های تب کریمه کنگو، تب دنگ، SFTSV و تب دره ریفت به روش OneStep RT-PCR	نتیجه با کیت GA Arbo Hemorrhagic One Step RT-PCR
نمونه منفی از نظر ویروس های تب کریمه کنگو، تب دنگ، SFTSV و تب دره ریفت	۳۰	۳۰
نمونه مثبت از نظر ویروس های تب کریمه کنگو، تب دنگ، SFTSV و تب دره ریفت	۵	۵



مشاوره، راه اندازی، تعمیر و تعین کدب اعلام بخش مولکولی

تهران، اشرافی اصفهانی، جنب درمانگاه بهراد، ساختمان شماره ۵۴، طبقه دوم واحد ۴، تلفکس: ۰۲۱-۴۴۰۰۱۵۸-۶

	Do not use after the year, month and date mentioned		Manufacturer		Do not re-use
	Upper limit of temperature		Keep away from sunlight		Temperature limit
	Read Instructions before Use		Catalog number		Batch code
	IVD in vitro diagnostic		Sufficient for		Manufacturing date