

## راهنمای کیت تشخیص مولکولی جنس ارتوپاکس و مانکی پاکس

نام محصول: GA OrthoMonkey POX RT-PCR Kit

کد محصول: GA-OrthoPOX.100

معرفی

جنس ارتوپاکس از خانواده پاکس ویریده، شامل ۱۲ جنس می‌باشد که معمولاً پستانداران، بندپایان و انسان را آلوده میکند. در این جنس ویروس‌های مهمی مانند واریولا (آبله انسانی)، آبله گاو، آبله اسب، آبله شتر و آبله میمون وجود دارند. اخیراً آبله میمونی که در سال ۱۹۵۸ کشف شده است در دنیا شیوع دوباره پیدا کرده است که نیاز به تشخیص و افتراق مولکولی آن بیشتر شده است. این ویروس در انسان می‌تواند باعث علائم شبه آنفلوآنزا، بثورات جلدی، لنفادنوپاتی و مرگ شود. آبله میمون دارای دو Clade با نام‌های Clade I (حوضه کنگو) و Clade II (حوضه غرب آفریقا) می‌باشد که Clade II دارای دو Sub Clade با نام a و b بوده که نوع b عمدتاً عامل شیوع جهانی این ویروس در سال ۲۰۲۲ می‌باشد.<sup>۱۲</sup> کیت GA OrthoMonkey POX RT-PCR قابلیت افتراق جنس آبله میمون از سایر اعضای جنس ارتوپاکس و همچنین تعیین نوع Clade آن را دارا می‌باشد که اطلاعات بدست آمده حاصل از انجام آزمایش با این کیت می‌تواند به عنوان یک عامل کمک کننده همراه با علائم بالینی در افتراق بیماری‌های مشابه باشد.

### اساس تست

مخلوط پرایمر و پروب این کیت به صورت مولتی پلکس سه تایی بوده که نواحی هدف از ویروس‌های جنس ارتوپاکس و بصورت اختصاصی Clade I, II ویروس آبله میمون را در کانال‌های جداگانه شناسایی می‌کند که در آن صورت توسط مخلوط واکنش موجود در کیت این نواحی تکثیر شده و آزاد سازی سیگنال فلورسنس ایجاد شده توسط دستگاه Real Time PCR مورد سنجش قرار می‌گیرد. کنترل داخلی در این کیت شامل یک طراحی پرایمر و پروب اختصاصی برای ژن بتا ۲ میکروگلوبولین بصورت اندوژن می‌باشد که علاوه بر بررسی مراحل نمونه برداری و استخراج الگو، کیفیت قابل قبول DNA استخراج شده را مشخص می‌کند تا مانع از ایجاد نتایج منفی کاذب شود.

### محتویات کیت

این کیت حاوی موارد مورد نیاز آزمایش به فرمت ۱۰۰ تستی بوده که به شرح زیر می‌باشد:

ردیف	محلول	مقادیر	تعداد
۱	GA OrthoMonkey POX Mastermix	۵۰۰ میکرولیتر در هر ویال	۲ ویال ۵۰ تستی
۲	GA OrthoMonkey POX Positive Control	۱۰۰ میکرولیتر در هر ویال	۱ ویال
۳	GA OrthoMonkey POX Negative Control	۱۰۰ میکرولیتر در هر ویال	۱ ویال

### شرایط نگهداری

- دمای نگهداری این کیت  $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$  می‌باشد.
- 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 می‌باشد، تاریخ انقضاء کیت بر روی کیت درج شده است.

### دستگاه‌های هماهنگ با کیت

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

### مشخصات نمونه

نمونه مورد استفاده در این کیت ضایعات پوستی شامل سوپ از سطح یا ترشحات ضایعه، سقف یک یا چند ضایعه و پوسته‌های ضایعه می‌باشد. توجه شود که ضایعات، پوسته‌ها و مایع ویکولار با هم مخلوط نشود و در ظرف نمونه‌گیری جدا قرار گیرد (یکی از انواع نمونه‌ها تست شود و در صورت ضرورت نمونه دوم)<sup>۳</sup>

### آماده سازی الگو پیش از آزمایش

الگو مورد نیاز برای انجام این تست، DNA ویروسی بوده که می‌توان طبق پروتکل استاندارد کیت‌های معتبر استخراج ژنوم ویروسی عمل کرد. DNA استخراج شده بصورت مستقیم قابل استفاده برای انجام آزمایش می‌باشد و در غیر اینصورت DNA استخراج شده را در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری کنید. همچنین تا حد امکان از فریز و دفریز کردن مکرر نمونه DNA خودداری کنید.

### آماده سازی مخلوط واکنش

محتویات کیت را از داخل جعبه آن خارج کنید و اجازه دهید تا به دمای اتاق رسیده و کاملاً بصورت مایع در آیند. پس از رسیدن محلول‌ها به دمای اتاق، چند ثانیه ویال‌ها را اسپین کنید و سپس طبق موارد زیر عمل کرده و برای هر نمونه دو تیوب واکنش را آماده کنید:

۱. به هر کدام از تیوب‌های واکنش اول ۱۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش GA OrthoMonkey POX Mastermix (حاوی مواد مورد نیاز واکنش، پرایمر و پروب) اضافه کنید.

### اضافه کردن الگو (DNA) به مخلوط واکنش

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

★ تیوب‌های نمونه‌های مجهول: به هر کدام از تیوب‌های واکنش مورد سنجش، ۱۰ میکرولیتر الگو DNA اضافه کنید (الگو را حتماً چندبار رقیق کنید).

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

★ سپس درب تیوب‌های ذکر شده را بسته و اسپین کنید (در صورت استفاده از دستگاه‌های Real Time PCR دارای روتور چرخان نیازی به اسپین کردن تیوب‌ها نمی‌باشد).

۳. تیوب کنترل مثبت: در یک فضای دیگر و دور از محوطه آماده سازی سایر مخلوط‌های 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 GA OrthoMonkey POX Mastermix (FAM, HEX, TEXAS RED, CY5)
۱۰ میکرولیتر	الگو (DNA). کنترل منفی یا کنترل مثبت
۲۰ میکرولیتر	حجم نهایی واکنش

★ قابل ذکر است می‌توان در زمان استخراج الگو در آخرین مرحله استخراج، با دو برابر کردن حجم Elution بافر (از ۵۰ میکرولیتر به ۱۰۰ میکرولیتر) از میزان مهارکنندگی الگو کاسته تا واکنش با کیفیت بهتری انجام شود.

### انجام واکنش RealTime PCR

۱. نام‌گذاری نمونه‌ها:

تیوب‌ها را داخل دستگاه Real Time PCR قرار داده و بعد از آن هر کدام از تیوب‌ها (نمونه‌های مجهول، کنترل مثبت و کنترل منفی) را نام‌گذاری کنید.

۲. انتخاب کانال سنجش:

کانال سبز یا FAM را برای تشخیص جنس ارتوپاکس، کانال زرد یا HEX برای تشخیص Clade II ویروس آبله میمون، کانال نارنجی یا ROX برای تشخیص ژن کنترل داخلی و کانال قرمز یا CY5 را برای تشخیص Clade I ویروس آبله میمون در دستگاه Real Time PCR انتخاب کنید.

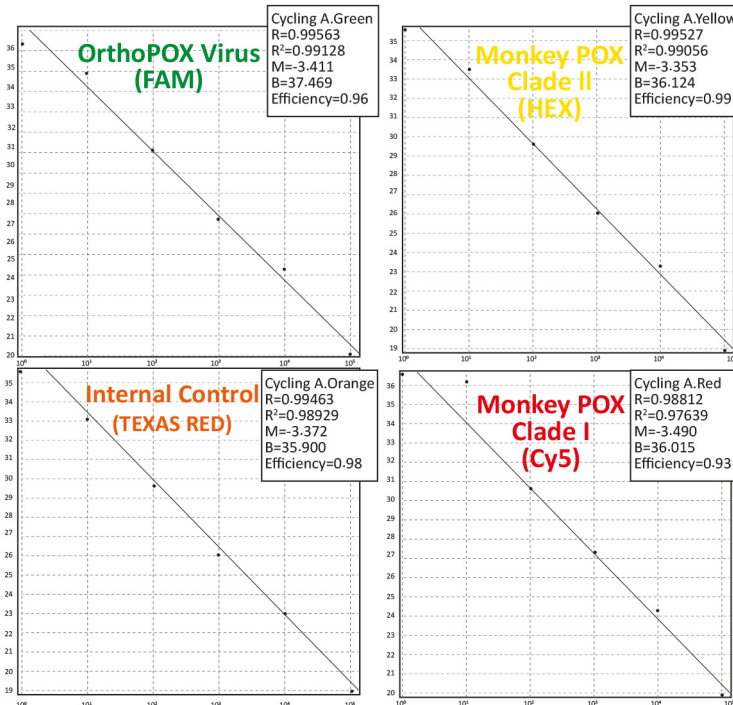
۳. برنامه دمایی و زمانی واکنش مورد نظر مطابق با شرایط جدول زیر می‌باشد:

برنامه دمایی و زمانی استاندارد کیت GA OrthoMonkey POX RT-PCR			
ترتیب واکنش	مرحله	دما	زمان
۱	Holding	$25^{\circ}\text{C}$	۵ دقیقه
۲	Holding	$95^{\circ}\text{C}$	۳ دقیقه
۳	Denaturation	$94^{\circ}\text{C}$	۵ ثانیه
		Annealing, Extension and fluorescence measurement	$60^{\circ}\text{C}$
	cycling		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:

مراحل	حالت مورد نظر	رد یا قبول بودن واکنش
۱. مرحله اول بررسی کنترل مثبت	بدون گراف تکثیر یا سیگنال سیگموتیدی یا میزان فلورنس غیر قابل قبول در هر کدام از کانال‌ها	قبول - عدم آلودگی مخلوط واکنش
	داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq بالاتر از ۴۰ در هر کدام از کانال‌ها	قبول با یک شرط - در این حالت تنها نمونه‌های بیمارار دارای Cq یا فاصله حداقلی ۶ سیکل از آلودگی در کانال مربوطه را می‌توان به عنوان نمونه‌های دارای ژنوم ویروس مورد قبول دانست.
۲. مرحله دوم بررسی کنترل منفی	داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq بالاتر از ۳۵ در هر کدام از کانال‌ها	قبول با شرط - در این حالت تنها نمونه‌های دارای Cq یا فاصله حداقلی ۶ سیکل از آلودگی در کانال مربوطه را می‌توان به عنوان نمونه‌های دارای ژنوم ویروس مورد قبول دانست.
	داشتن سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۳۵ 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 ۳۵ قابل تفسیر نمی‌باشند.
۳. مرحله سوم بررسی نمونه‌ها	دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۳۵ در هر کدام از کانال‌ها	قبول - عملکرد صحیح پرایمر و پروب، مخلوط واکنش و عدم تخریب کنترل مثبت یا دیگر اعضاء واکنش که نشان از نگهداری صحیح آن دارد.
	دارای سیگنال سیگموتیدی اما Cq بالاتر از ۳۵ در هر کدام از کانال‌ها	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 می‌توانید از این عیب صرف نظر کنید.
	۱. تنها کانال نارنجی دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۳۵ است و بقیه کانال‌های منفی می‌باشند.	قبول واکنش و نتیجه منفی - نمونه گیری، استخراج الگو و انجام PCR به درستی انجام شده است و واکنش از نظر وجود ویروس های ارتوپاکس و آبله میمون منفی می‌باشد.
	۲. تنها کانال سبز دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰ است و بقیه کانال‌ها دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰ نمی‌باشند.	نتیجه مثبت - وجود ژنوم از جنس ارتوپاکس ویروس در واکنش و با احتمال بیشتر ویروس آبله میمونی از نوع واریانت های جدید (نیاز به بررسی سکلسن بای)
۴. مرحله چهارم بررسی نمونه‌ها	۳. تنها کانال زرد یا همراه با کانال سبز دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰ است و بقیه کانال‌ها دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰ نمی‌باشند.	نتیجه مثبت - وجود ژنوم ویروس آبله میمونی از نوع Clade II
	۴. کانال سبز یا کانال زرد همراه با کانال قرمز یا هر سه کانال سبز، زرد و قرمز دارای سیگنال سیگموتیدی و Cq کمتر از ۴۰ است.	نتیجه مثبت - وجود ژنوم ویروس آبله میمونی از نوع Clade I



منحنی استاندارد پرایمر و پروب‌های کیت GA OrthoMonkey POX RT-PCR در کانال‌های سبز، زرد، نارنجی و قرمز

Analytical Sensitivity کیت (LoD) برای تارگت‌های مورد نظر ۵۰ کپی در هر واکنش است. Sensitivity Diagnostic کیت بالاتر از ۹۵ درصد می‌باشد و رنج دینامیک و رنج خطی کیت موجود برابر با  $10^1$  تا  $10^9$  می‌باشد. عرض از مبدا واکنش (میزان Cq قابل قبول در کمترین کپی) در سیکل ۴۰ بوده و ضریب همبستگی واکنش ( $r^2$ ) یا میزان تطابق با منحنی استاندارد در حدود ۰٫۹۹ درصد می‌باشد. همچنین بازده واکنش در کانال‌های مختلف برابر با ۹۳ تا ۹۹ درصد است.

### خطرات و پیشگیری

۱. لطفا پیش از استفاده راهنمای کیت را با دقت مطالعه کنید. پرسنل آزمایشگاه باید آموزش دیده و آشنایی کامل با روند و خطرات دستگاه‌ها را داشته باشند. تمام وسایل و امکانات باید پیش از استفاده استریل بوده و این وسایل جابه جایی بین بخش‌های 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 می‌شود از تیپ‌های فیلتردار استفاده شود.
۲. این کیت تنها قابلیت استفاده در شرایط آزمایشگاهی را دارد و کاربرد دیگری برای آن تعریف نشده است. همچنین کنترل کیفی برای هر آزمایش انجام شود.
۳. مدیریت آزمایشگاه طبق دستورالعمل‌های آزمایشگاه‌های مولکولی انجام گیرد. تمام نمونه‌ها باید به صورت بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند و باید در یک فضا یا هود با کلاس ایمنی زیستی سطح II مورد پردازش قرار گیرد. پرسنل تمامی تمهیدات لازم مانند تجهیزات حفاظت شخصی (PPE) که شامل استفاده از دستکش‌های یکبار مصرف، عینک، گان یا روپوش آزمایشگاهی می‌شود را رعایت کند. به همراه این کیت لوازم محافظتی شخصی مورد نیاز وجود ندارد و لازم است قبل از استفاده تهیه شود.
۴. پرسنل در طی انجام مراحل استخراج یا آماده‌سازی مخلوط واکنش، دستکش‌های خود را بین هر مرحله باید مرتب تعویض کند تا از ایجاد آلودگی‌های 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 زباله‌های عفونی این تست به مانند دیگر عوامل بیماری‌زا می‌باشد.
۵. شرایط نگهداری این کیت به مدت ۳ روز در دمای یخچال یا در پک‌های یخی می‌باشد که برای نگهداری طولانی مدت و حفظ نیمه عمر محصول آن را در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  قرار دهید.

1. Multi-country monkeypox outbreak in non-endemic countries. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON385>
2. Monkeypox: experts give virus variants new names. <https://www.who.int/news/item/122022-08-monkeypox-experts-give-virus-variants-new-names>
3. Laboratory testing for the monkeypox virus: Interim guidance. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-MPX-laboratory-2022.1>



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

- 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
- Catalogue number
- Sufficient for
- Do not re-use
- Temperature limit
- Batch code
- Manufacturing code

### حد آستانه مثبت

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

### محدودیت‌های روش تشخیص

۱. زمان نمونه‌گیری و انجام نمونه‌گیری نامناسب، انتقال نادرست، پردازش نامناسب نمونه، شرایط بد نگهداری کیت، عدم صحیح انجام واکنش توسط کاربر می‌تواند باعث ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.
۲. آلودگی نمونه به بعضی مواد یا داروهای خاص و یا آلودگی در حین پردازش نمونه می‌تواند باعث ایجاد نتیجه منفی کاذب شود.
۳. امکان ایجاد جهش و تغییرات توالی هدف در ویروس‌های خانواده پاکس می‌تواند 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 و ارزیابی محصول

پرایمر و پروب‌های این کیت براساس توالی ژن‌های محافظت شده اختصاصی جنس ارتوپاکس، آبله میمون و نیاک حوضه کنگو ویروس آبله میمون طراحی شده است و توانایی بالایی در شناسایی این توالی از خود نشان داده است. همچنین طراحی انجام شده هیچ واکنش متقاطع با دیگر توالی‌های ژنومی انسانی، ویروسی و باکتریایی در تست *in silico* از خود نشان نداده است.

جدول نمونه ارزیابی بالینی کیت GA OrthoMonkey POX RT-PCR Kit		
نوع نمونه	نتیجه با کیت تجاری مشابه	نتیجه با کیت GA OrthoMonkey POX RT-PCR Kit
نمونه مثبت از نظر جنس ارتوپاکس و نمونه اختصاصی آبله میمون	۵ نمونه مثبت	۵ نمونه مثبت
نمونه منفی	۵۰ نمونه منفی	۵۰ نمونه منفی