Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit

Quantitative Real Time-PCR Assay

کیت تشخیص مولکولی HBV به روش Quantitative Real Time-PCR

برای استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی

By ROJE

Edition, 01/2022

گروه تولیدی روژه تکنولوژی از سال ۲۰۱٤ طیف وسیعی از کیت‌های بیولوژی مولکولی را تولید می‌کند. محققین در روژه به صورت دائمی در حال طراحی، خلق و بهبود انواع محصولات جدید می‌باشند که می‌تواند تحقیقات بیولوژی مولکولی را آسانتر کند و در دسترس همه‌ی محققین قرار دهد. هدف روژه ارائه محصولات و بافرهای تشخیصی بیولوژی مولکولی قابل رقابت با پیشروهای صنعت بیوتکنولوژی برای مراکز تحقیقاتی، آزمایشگاه‌ها، کلینیک‌ها، بیمارستان‌ها و مراکز تشخیص طبی در سراسر دنیا می‌باشد.

2022 ROJETechnologies, all rights reserved

فهرست

محتویات Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit ٤
شرایط نگهداری ٤
موارد مصرف ٤
گارانتی ٤
قابل توجه خریدار محترم ٤
هشدار و اقدامات احتیاطی ٥
کنترل کیفیت ٦
وسایلی که باید توسط کاربر تامین گردد ٦
شرح محصول ٦
کاربرد ٨
ویژگیها ٨
بیماری زایی ٩
مقدار نمونه مورد نیاز برای شروع واکنش ١٠
جمع آوری و آماده سازی نمونه ١٠
قبل از شروع کار ١٠
آماده سازی اجزای واکنش ١٢
آماده سازی محیط کار ١٣
پروتکل ١٤
تفسیر نتایج ٢٠
محدودیتها ٢٢
آزمایشهای ارزیابی و معتبرسازی ٢٢
حساسیت بالینی ٢٧
نمادها ٣٣
عیب‌یابی ٣٥
اطلاعات سفارش ٣٦
پشتیبانی فنی ٣٦
آدرس کارخانه ٣٦
منابع ٣٧

محتویات Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit

اجزاء کیت	۲۵ واکنش	۱۰۰ واکنش
Pro HBV Mix	۲۲۰µl	۸۷۵µl
QD-ROMAX, 4X	۱۶۰µl	۶۲۵µl
IC	۱۲۵µl	۵۰۰µl
HBV *QS1(1×10^5 IU/µl)	۶۵µl	۲۵۰µl
HBV *QS2(1×10^4 IU/µl)	۶۵µl	۲۵۰µl
HBV *QS3(1×10^3 IU/µl)	۶۵µl	۲۵۰µl
HBV *QS4(1×10^2 IU/µl)	۶۵µl	۲۵۰µl
HBV *QS5(1×10^1 IU/µl)	۶۵µl	۲۵۰µl
Water for Molecular Biology	۱۲۵µl	۵۰۰µl

*استاندارد کمی

شرایط نگهداری

تمام اجزای Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit محلول‌های آماده برای استفاده هستند. پس از دریافت باید در دمای ۳۰- تا ۱۵- درجه سانتیگراد نگهداری کنید.

موارد مصرف

Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit، جهت تست تشخیص مولکولی ویروس هپاتیت B مورد استفاده قرار می‌گیرد. اساس کار این محصول Quantitative Real Time-PCR می‌باشد و قداوری تشخیص و تعیین کمی DNA ویروس هپاتیت B انسانی (HBV) از (ژنوتیپ‌های A تا H) در بانسمای انسانی را دارد. تمامی مواد موجود در کیت باید منحصراً در تشخیص In vitro به کار برده شوند.

گارانتی

روزه تکنولوژی کارایی تمام اجزای کیت را گارانتی می‌کند. برای اطلاع بیشتر در انتخاب محصول براساس نیازتان با متخصصین پشتیبانی روزه تماس حاصل فرمایید. چنانچه هر محصولی رضایت شما را جلب نکرد، اگر به دلیل استفاده نادرست از کیت نباشد و مشکل از روند تولید محصول باشد، تیم روزه محصول را برای شما جایگزین می‌کند.

قابل توجه خریدار محترم

این محصول فقط برای مصارف آزمایشگاهی است و برای مصارف تجاری توصیه نمی‌شود و حق فروش این کیت و سایر اجزای آن را ندارید. برای اطلاعات بیشتر در مورد مجوز فروش با توزیع با تیم فروش روزه تماس حاصل فرمایید.

هشدار و اقدامات احتیاطی

- قبل از اولین استفاده، محصول و اجزای آن را از نظر تعداد و حجم بررسی کنید. از محصول معیوب یا ناقص استفاده نکنید، عملکرد آن ممکن است تحت تاثیر قرار گیرد.
- از انواع دیگر نمونه جز پلاسمای انسانی استفاده نکنید! استفاده از انواع دیگر نمونه‌ها ممکن است عملکرد محصول را به خطر بیندازد.
- وجود مهارکننده‌های PCR (به عنوان مثال هپارین) ممکن است نتایج منفی یا نامعتبر کاذب ایجاد کند.
- شرایط نامناسب نگهداری ممکن است عملکرد محصول را به مخاطره بیندازد.
- عدم سانتریفوژ اجزای محصول پس از ذوب شدن می‌تواند منجر به آلودگی اجزای سازنده یا باقی‌مانده‌های واکنشگرها در درب تیوب شود و در نتیجه عملکرد محصول در معرض خطر قرار گیرد.
- از فریز و دفریز متوالی پرهیز کنید.
- از اجزای محصول بیش از تاریخ انقضای چاپ شده روی برچسب اجزاء استفاده نکنید.
- استفاده نادرست از اجزاء و نمونه‌های محصول ممکن است منجر به آلودگی شده که نتایج نادرست تشخیص آزمایشگاهی را به همراه دارد.
- درب ویال‌ها را جابجا نکنید، زیرا ممکن است آلودگی متقاطع ایجاد شود.
- برای به حداقل رساندن خطر انتقال آلودگی، مواد مثبت و یا مواد بالقوه مثبت، از سایر اجزای کیت جدا نگهداری شود.
- از مناطق کاری جداگانه استفاده کنید.
- همیشه دستکش یکبار مصرف بپوشید.
- درب تیوب‌های PCR را برای جلوگیری از آلودگی با امپلیکون‌ها باز نکنید.
- زمان ذخیره‌سازی PCR Mix را بیشتر نکنید. این می‌تواند عملکرد محصول را به مخاطره بیندازد.
- همیشه با نمونه‌ها به عنوان عوامل عفونی و خطرناک زیستی، طبق روش‌های آزمایشگاهی ایمن رفتار کنید. به عنوان مثال بعد از تست مواد به سرعت از ضد عفونی کننده مناسب استفاده کنید. مواد آلوده را به عنوان مواد زیستی خطرناک جابجا کنید.
- زباله‌های زیستی و خطرناک را مطابق با قوانین محلی و بین المللی دفع کنید تا از آلودگی محیط زیست اجتناب شود.
- مانند هر تست تشخیصی، نتایج باید با در نظر گرفتن تمام یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی تفسیر شود.
- موتاسیون‌های بالقوه درون توالی هدف ژنوم HBV که توسط پرایمر پروب‌های درون کیت پوشش داده شده است، ممکن است موجب عدم تشخیص حضور پاتوژن شود.

کاربر باید همیشه به نکات زیر توجه کند:

- استفاده از سرسمپلر های فیلتردار و RNase & DNase free
- نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای هپاتیت B (نمونه‌های گرفته شده از مریض، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR) باید در محلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده سازی مسترمیکس HBV صورت پذیرد.
- همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.

- بعد از ذوب کردن مواد آنها را مخلوط کرده و به طور مختصر سانتریفوژ کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طور کامل توصیه می‌شود.
- تمام مراحل مربوط به تهیه مسترمیکس باید بر روی یخ یا باکس‌های سرد (cooling box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به مسترمیکس بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.

کنترل کیفیت

محصول Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit توسط آزمایش‌های مشخص از پیش تعیین شده برای هر سری ساخت، مطابق با استانداردهای WHO و Clinical an Laboratory Standards Institute مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. برای اطلاع بیشتر از نتایج آزمایش‌ها می‌توانید از طریق سایت روژه و با استفاده از REF و Lot Number کیت خریداری شده درخواست Certificate of Analysis خود را ثبت کنید تا برای شما ارسال گردد.

وسایلی که باید توسط کاربر تامین گردد

- هنگام کار با مواد شیمیائي، همیشه رویوش مناسب آزمایشگاهي، دستکش یکبار مصرف، و عینک‌های محافظ داشته باشید.
- ورتکس
- دستکش بدون پودر (یکبار مصرف)
- لوله‌های 0.2 ml برای استفاده در روتور ۳۶ چاهکي یا لوله‌های ۰/۱ml برای استفاده در روتور ۷۲ چاهکي
- کیت جداسازی DNA (کیت تخلیص DNJia Virus DNA Kit)
- سمپلر قابل تنظیم
- نوک سمپلر فیلتردار
- سانتریفیوژ رومیزی
- بلوک حدنگ کننده
- دستگاه‌های Real Time-PCR

این کیت بر روی دستگاه‌های زیر قابل اجرا می‌باشد

- Rotor-Gene Q, 2plex
- Corbett Rotor-Gene 3000&6000
- Mic qPCR Cycler

شرح محصول

تشخیص مولکولي بر اساس اسیدهای نوکلئیک، تکنیکي حساس و با اختصاصیت بسیار بالاست که قادراست عوامل بیماریزا را در یک نمونه تعیین نماید. تست‌های تشخیصی مبتني بر واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و Real Time-PCR قادرند تا اسیدهای نوکلئیک را با ویژگي‌های مذکور شناسایي نمایند. در بیماران مشکوک به هپاتیت اولین گام در تشخیص همانطور که گفته شد تعیین آنتي ژن و آنتي بادی‌های ویروسي یا الایزا است. در صورت مثبت بودن تست و یا شک پزشک به منفي کاذب بودن تست جهت تایید نتایج الایزا تست مولکولي کیفي PCR انجام می‌گردد. در گام بعد حاد بودن و مزمن بودن رفتار ویروس، میزان تاثیر داروی تجویز شده توسط پزشک و بررسي ایجاد مقاومت دارویي احتمالي در بیمار به بررسي کمي لود ویروسي در خون و سرم احتیاج دارد. برای

این منظور به صورت مرتب و در فواصل زمانی مشخص لود ویروسی در بیماران به کمک روش‌های تشخیص مولکولی کمی Real Time-PCR مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. راحت‌ترین روش برای بدست آوردن یک مقدار مطلق از غلظت یک اسید نوکلئیک از نوع DNA یا RNA استفاده از استاندارد خارجی می‌باشد. در این حالت غلظت یک اسید نوکلئیک با غلظت مجهول، در اینجا قطعه‌ای حفظ شده از ژنوم هپاتیت B (HBV)، با توجه به منحنی کشیده شده از یک سری اسید نوکلئیک همجنس با غلظت مشخص (Homologous standards)، در اینجا امپلیکون کلون شده هپاتیت B، سنجیده و محاسبه می‌شود. حسن این کیت در داشتن طیف خطی گسترده در رقت‌های بسیار بالا و پایین HBV می‌باشد به طوری که بدون نیاز به رقیق کردن نمونه در حالت‌های بسیار غلیظ نمونه مجهول HBV، امکان سنجش به طور کامل وجود دارد. کیت تشخیص و سنجش مقدار ویروس هپاتیت B به روش Real Time-PCR باید نه تنها قادر به تشخیص صحیح و عاری از خطای ویروس هپاتیت B باشد بلکه بتواند انواع تیپ‌های ویروس را بدون تفاوت در تیپ آن شناسایی و تعیین مقدار کند. علاوه بر اختصاصیت، حساسیت، inter/intra assay، dynamic range و همچنین سنجش با تیتر مشخص ویروس استاندارد نیز بر روی این کیت انجام شده که نتیجه آن نشان از توانمندی بالای کیت در تشخیص و تعیین مقدار ویروس هپاتیت B دارد. همچنین برای کنترل واکنش‌ها از نظر داشتن مهار داشتن از مواد مهارکننده واکنش PCR یک کنترل داخلی (Internal Control) نیز برای این کیت طراحی شده که هم می‌توان آنرا از ابتدای فرآیند تخلیص اضافه کرد که در این حالت کل فرایند تخلیص و PCR از نظر مواد مهارکننده PCR چک می‌شود و یا تنها در طی فرآیند PCR آن را اضافه کرد که در این حال تنها مواد مهارکننده مرحله PCR را می‌تواند نشان دهد. این کنترل داخلی از نظر نداشتن هیچ گونه واکنشی با خود ویروس هپاتیت B، ژنوم انسان و عده‌ای از ویروس‌های شایع خونی به طور کامل چک گردیده است.

Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit توان تکثیر اسید نوکلئیک در شرایط in vitro را برای تعیین کمی DNA ویروس هپاتیت B (HBV) در بافتهای انسانی دارا می‌باشد. این کیت برای کاربرد در دستگاه Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 و Rotor-Gene Q طراحی شده است.

معرفی اجزای کیت

برای عرضه‌گیری‌های گسترده، تشخیص سریع و دقیق HBV از اهمیت اساسی برخوردار است. کیت تشخیص HBV براساس Real Time-PCR با حساسیت بالا این اهداف را برآورده کرده است. علاوه بر سیستم تکثیر و تشخیص اختصاصی DNA ویروس هپاتیت B، این روش شامل الیگونوکلئوتیدها برای تکثیر و تشخیص IC یا کنترل داخلی می‌باشد. IC یا کنترل داخلی را به طور دستی در آغاز تخلیص اسید نوکلئیک اضافه می‌کنیم. پروب‌های اختصاصی برای HBV DNA با فلوروفور FAM (سبز) لیبل‌گذاری شده است. پروب مخصوص کنترل داخلی با فلوروفور قابل بررسی در کانال VIC (زرد) لیبل‌گذاری شده است.

- **محلول‌های QD-ROMAX و Pro HBV Mix**

حاوی تمام اجزای سازنده (بافر PCR، DNA پلیمراز، نمک منیزیم، پرایمرها و پروب‌ها) هستند تا امکان تکثیر به واسطه PCR و تشخیص هدف DNA ویروس هپاتیت B و کنترل داخلی را در یک واکنش فراهم کنند.

- **Quantification Standards (استانداردهای کمی)**

استانداردهای کمی (QS) حاوی غلظت‌های مشخص از استاندارد DNA ویروس هپاتیت B است. آنها با استانداردهای بین المللی که برای تکنیک تکثیر نوکلئیک اسید DNA ویروس هپاتیت B هستند، کالیبره شده‌اند. از استانداردهای کمی برای بررسی عملکرد تکثیر DNAویروس HBV و همچنین ایجاد و رسم منحنی استاندارد استفاده می‌شود، که به شما اجازه می‌دهد تعداد کمی DNA ویروس HBV را در یک نمونه تعیین کنید.

جدول ۱: استانداردهای کمی

Quantification Standards	IU/µl
HBV QS1	1×10^5
HBV QS2	1×10^4
HBV QS3	1×10^3
HBV QS4	1×10^2
HBV QS5	1×10^1

- NTC یا کنترل فاقد الگو
- NTC یا کنترل فاقد الگو نمونه‌ای است که فاقد DNA ویروس HBV بوده ولی شامل نمونه کنترل داخلی می‌باشد.
- NTC به عنوان کنترل منفی برای DNA ویروس HBV در واکنش Real Time-PCR استفاده می‌شود و نشان‌دهنده آلودگی احتمالی Q-ROMAX و Pro HBV Mix است.

کاربرد

Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kitیک کیت تشخیص مولکولی برای تشخیص و تعیین مقدار DNA ویروس هپاتیت B در پلاسمای انسان است. این امر مبتنی بر فناوری Real Time-PCR می‌باشد که برای تکثیر ژنوم ویروس هپاتیت B از پرایمرهای خاص و پروب‌های خاص دارای برچسب فلورسنت استفاده می‌شود.

ویژگی‌ها

تکنولوژی	Real Time-PCR
نوع تجزیه و تحلیل	Quantitative
توالی هدف	ژن HBsAg
ویژگی آنالیتیکال	این کیت قادر به تشخیص ژنوتیپ‌های A-H ویروس HBV می‌باشد. نمونه‌های سالم (HBV negative): اختصاصیت ۱۰۰٪
حساسیت آنالیتیکال	برای تعیین LoD از استاندارد پنجم Acrometrix که دارای بار ویروسی ۲۰۰ IU/ml می‌باشد رقت‌های ۴۰، ۲۰، ۱۰ IU/ml در ماتریکس واقعی (پلاسما) تهیه شد. سپس این نمونه‌ها با

	استفاده از کیت جداسازی DNA (کیت تحلیص DNJia Virus DNA) Kit تحلیص شدند. از مطالعات LoD برای تعیین کمترین غلظت قابل تشخیص ژنوم ویروس HBV استفاده شد، که در آن تقریباً ۹۵٪ از کل نمونه‌ها (مثبت واقعی) نتیجه مثبت را تکرار کردند (آزمایش با ۲۰ تکرار از هر رقت بعد از استخراج استفاده شد). طبق دستورالعمل FDA کمترین حد تشخیص یا LoD باید تعداد جواب مثبت از هر رقت ۱۹/۲۰ تکرار باشد. از نمونه‌های تهیه شده ۲۰ تکرار از هر رقت گذاشته شد و نتیجه زیر بدست آمد. کمترین حد تشخیص در کیت Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit برابر ۴۰ IU/ml می‌باشد.
ویژگی تشخیصی	100% (CI95%: 99.06% –100%)
حساسیت تشخیصی	97/87% (CI95%: 99.90% –100%)
بازه خطی	10^{9}-10^{2}IU/ml
بازه دینامیکی	10^{9}-40IU/ml
نحوه گزارش نتایج	IU/ml
استاندارد بین المللی	کد Acrometrix: 625607
قابلیت کنترل آلودگی PCR و کنترل بازده استخراج DNA	PCR inhibition and DNA extraction efficiency control
نمونه مورد استفاده	پلاسما/سرم
شرایط نگهداری	۳۰- تا ۱۵- درجه سانتیگراد
روش استخراج پیشنهادی	DNJia Virus DNA Kit (DN983056)
دستگاه‌های پیشنهادی	Rotor-Gene Q, 2plex, Corbett Rotor-Gene 3000&6000, Mic qPCR Cycler
کانال‌های تشخیصی مورد نیاز	Green-Yellow

بیماری زایی

ویروس هپاتیت B (HBV) باعث بیماری هپاتیت B می‌شود. ویروس هپاتیت B در میان عوامل بیماری‌زای ویروسی انسان، منحصر به فرد می‌باشد، زیرا ویروسی DNA دار است که از طریق واسطه RNA تکثیر می‌شود. ساختار ژنومی HBV فشرده و پیچیده می‌باشد. توانایی بیان کردن هفت پروتئین مجزا را با ژنوم با طول ۳/۲ کیلوبار را دارد. این پروتئین‌ها شامل: پروتئین پلیمراز (ژن Pol)، آنتی ژن اصلی (HBsAg) و آنتی ژن e (HBeAg)، پروتئین‌های آنتی ژن سطح بزرگ، متوسط و کوچک (ژن S) و پروتئین X (ژن X) می‌باشند. HBV از طریق خون یا مایعات دیگر بدن منتقل می‌شود و می‌تواند حداقل به مدت هفت روز در خارج از بدن زنده بماند. متداول‌ترین نوع انتقال، انتقال مادر به جنین در حین بارداری و انتقال افقی بین کودکان تا سن ۵ سال است. منابع عفونت نیز ابزارهای جراحی پزشکی، سوزن‌های خال‌کوبی یا تیغ‌های آلوده به خون هستند. ویروس ممکن است ۳۰ تا ۶۰ روز پس از عفونت مشهود باشد و می‌تواند در بدن باقی بماند. فرد آلوده می‌تواند به هپاتیت B مزمن مبتلا شود. علائم از زردی پوست و چشم (یرقان) و ادرار تیره گرفته تا خستگی مفرط، حالت تهوع، استفراغ و شکم درد که ممکن است چندین هفته ادامه دار باشد، است. اما ناقلین می‌توانند بدون علامت باشند. بدترین موارد ایجاد هپاتیت حاد یا مزمن، همراه با پیشرفت به سیروز کبدی یا کارسینوم هپاتوسلولار (HCC) است. هپاتیت B تاکنون قابل درمان نبوده است. با این حال، دارو برای درمان علائم موجود است و کاهش سرعت سیروز نیز محتمل می‌باشد. با وجود واکسیناسیون، عفونت‌های ویروس هپاتیت B هنوز در سراسر جهان بسیار شایع است.

هپاتیت B به عنوان یک مشـــکل بهداشـــت جهانی باقی مانده اســـت که حدود ۲۴۰ میلیون نفر از عفونت مزمن HBV رنج می‌برند و ۸۸۷۰۰۰ مرگ و میر ناشی از HBV در سال (تعداد از سال ۲۰۱۵ دوباره افزایش یافته است) می‌باشد. شیوع ویروس هپاتیت B بالاترین آمار را در افیانوس آرام غربی و آفریقا دارد که به ترتیب ۶/۲٪ و ۶/۱٪ جمعیت بزرگســـال آن‌ها آلوده هســـتند. عفونت‌ها همچنین در مناطق مشخص شده توسط WHO مانند مدیترانه شرقی، آسیای جنوب شرقی، اروپا و قاره آمریکا رخ می‌دهد، بنابراین، تقاضای زیادی برای آزمایش هپاتیت B ویروسی به عنوان بخشی مهم در تمام اقدامات پیشگیری و درمان وجود دارد.

مقدار نمونه مورد نیاز برای شروع واکنش

ابتدا باید ۲-۵ سی سی خون تام بیمار داخل لوله حاوی ضد انعقاد EDTA اضافه شود. پس از جداسازی پلاسما و استخراج DNA طبق پروتکل کیت استخراج، مقدار ۱۰ میکرولیتر DNA استخراج شده برای واکنش Real Time-PCR مورد استفاده قرار گیرد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه

پلاسمای انسانی برای استفاده با Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit تأیید شده است. از انواع دیگر نمونه استفاده نکنید! استفاده از انواع دیگر نمونه ممکن است عملکرد محصول را تحت تاثیر قرار دهد. خون باید با سیستم‌های استاندارد تجاری جمع‌آوری خون موجود در بازار (به عنوان مثال Sarstedt، Becton Dickinson، Greiner یا معادل آن) جمع‌آوری شود. محتوای لوله باید مستقیماً پس از جمع‌آوری نمونه همگن شود. نمونه‌های خون باید در دمای (۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شود. حمل و نقل باید به دنبال دستورالعمل‌های محلی و ملی برای حمل مواد بیولوژیکی انجام شود. برای به دست آوردن پلاسما، کل خون باید طبق دستورالعمل ارائه شده تا ۲۴ ساعت پس از جمع‌آوری، سانتریفیوژ شود. قبل از استفاده پلاسما نباید بیش از ۴ ساعت در دمای اتاق (۲۰ - ۲۵ درجه سانتیگراد)، یک روز در دمای ۲ - ۸ درجه سانتی‌گراد یا ۲ ماه در دمای ۲۵- تا ۱۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری شـــود. همیشـــه طبق روش‌های آزمایشـــگاهی ایمن، با نمونه‌ها به عنوان نمونه‌های عفونی و (بیو) خطرناک رفتار کنید. به عنوان مثال در صورت نشت نمونه سریعاً از ضد عفونی کننده مناسب استفاده کنید. مواد آلوده را به عنوان مواد زیستی خطرناک جابجا کنید. نمونه‌های فریز شـــده عملکرد کیت را تحت تاثیر قرار می‌دهد. هنگام کار با نمونه‌های منجمد، مطمئن شـــوید که نمونه‌ها کاملاً ذوب شده و به درستی قبل از استفاده مخلوط شده‌اند. نمونه‌ها باید با احتیاط بسیار گرفته شده و در نهایت دقت، حمل و نقل شوند و کار با آنها صـــورت گیرد، زیرا نمونه‌ها دارای ریســـک بالقوه برای آلوده کردن فرد و محیط با ویروس هپاتیت B می‌باشـــد. مطلوب‌ترین نوع نمونه، پلاسما با ضد انعقاد EDTA می‌باشد که این نوع نمونه برای این کیت به طور کامل مورد بررسی قرار گرفته و کاملا مورد تایید می‌باشد. سایر انواع نمونه (غیر از پلاسمای همراه EDTA) دارای هیچ گونه ضمانت عملکردی نبوده و سازنده در مورد آن هیچگونه مسئولیتی ندارد.

توجه: اگر چه هپارین یکی از پرکاربردترین مواد ضد انعقاد می‌باشد به هیچ عنوان نباید برای نمونه‌های خونی که برای آنالیز توسط این کیت مورد استفاده قرار می‌گیرد به کار رود.

قبل از شروع کار

- قبل از اولین اسـتفاده، محصـول و اجزای آن را از نظر تعداد و حجم بررسـی کنید. از محصـول معیوب یا ناقص اسـتفاده نکنید، عملکرد آن ممکن است تحت تاثیر قرار گیرد.

- از انواع دیگر نمونه جزء بافتهای انسانی استفاده نکنید! استفاده از انواع دیگر نمونه‌ها ممکن است عملکرد محصول را به خطر بیندازد.
- استفاده نادرست از اجزاء و نمونه‌های محصول ممکن است منجر به آلودگی شده که نتایج نادرست تشخیص آزمایشگاهی را به همراه دارد.
- حتما از سر سمپلر های فیلتردار و RNase & DNase free استفاده کنید.

آماده سازی اجزای واکنش
آماده سازی مسترمیکس

حجم نمونه تخلیص شده مورد استفاده شده در این تست باید ۱۰ میکرولیتر باشد که براساس این حجم نمونه مورد آزمایش به جدول ۲ مراجعه کنید. مقادیر لازم برای آمادهسازی هر لوله تست یا استاندارد و کنترل منفی در جداول ۴،۳ و ۵ آورده شده است. در صورت استفاده از کنترل داخلی، موضوع بحث بعدی در مورد کنترل داخلی را مطالعه کنید.

نکته: آماده سازی مسترمیکس را به صورت یکبار مصرف انجام دهید و Pro HBV Mix را تا زمانی که احتیاج به انجام تست ندارید به QD-ROMAX, 4X اضافه نکنید.

جدول ۲: آماده سازی اجزای واکنش (کنترل داخلی در مرحله تخلیص برای تایید جداسازی DNA و بررسی مهار PCR اضافه شده است) به ازای یک واکنش

اجزاء مورد نیاز	حجم
Pro HBV Mix	8.75µl
QD-ROMAX, 4X	6.25µl
Purified DNA	10µl

جدول ۳: مقادیر لازم برای آمادهسازی هر لوله استاندارد در جدول زیر آورده شده است.

Standards	Volume per tube	تهیه مسترمیکس به ازای یک واکنش (Pro HBV Mix + QD-ROMAX, 4X)
HBV QS1	10µl	15µl
HBV QS2	10µl	15µl
HBV QS3	10µl	15µl
HBV QS4	10µl	15µl
HBV QS5	10µl	15µl

جدول ۴: مقادیر لازم برای آماده سازی هر لوله تست در جدول زیر آورده شده است.

Volume per tube of unknown sample	تهیه مسترمیکس به ازای یک واکنش (Pro HBV Mix + QD-ROMAX, 4X)

15µl	10µl

جدول ۵: مقادیر لازم برای آماده‌سازی هر لوله کنترل منفی در جدول زیر آورده شده است.

تهیه مسترمیکس به ازای یک واکنش (Pro HBV Mix + QD-ROMAX, 4X)	Volume per tube of water*
15µl	10µl

نکته: لازم به ذکر است که در هر بار انجام تست یک لوله به عنوان No Template Control (NTC) باید گذاشته شود.

بر اساس جدول فوق در NTC به جای نمونه استخراج شده آب استفاده می‌شود. تیوب NTC برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.

آماده سازی محیط کار

تمامی سطوح کاری، سمپلرها، سانتریفیوژها و سایر ملزومات قبل از استفاده تمیز و ضدعفونی گردد. باید از ترکیبات ضدعفونی کننده نظیر هیپوکلریت سدیم ۱۰٪، اتانول ۷۰٪ و یا RNZO (Cat NO:RN983048) جهت کاهش خطر آلودگی با اسید نوکلئیک استفاده کرد.

اساس کار

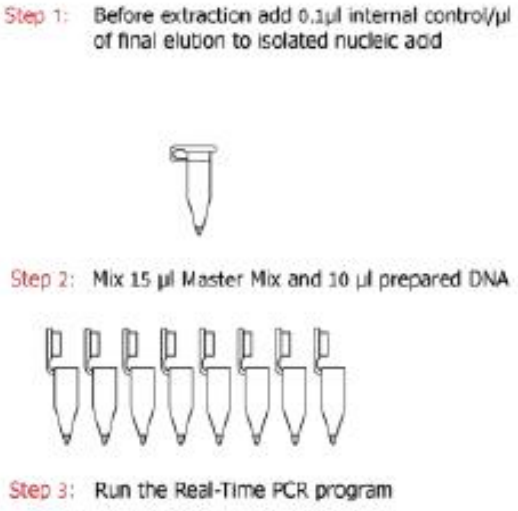
Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit یک آزمایش تشخیصی در شرایط آزمایشگاهی برای تشخیص و تعیین مقدار DNA ویروس هپاتیت B در پلاسمای انسان است. برای این منظور مخلوط پرایمر و پروب این کیت به روش TaqMan Real Time-PCR طراحی شده که توالی ژنومی محافظت شده از ویروس HBV را بعنوان هدف قرار داده و همزمان با کنترل داخلی تکثیر می‌کند. با استفاده از مخلوط واکنش موجود در کیت تکثیر ژن هدف به صورت کمی و از طریق افزایش سیگنال فلورسانس توسط دستگاه‌های Real Time-PCR اندازه‌گیری می‌شود. علاوه بر سیستم تکثیر و تشخیص اختصاصی DNA ویروس هپاتیت B، این روش شامل الیگونوکلئوتیدها برای تکثیر و تشخیص IC یا کنترل داخلی می‌باشد. IC یا کنترل داخلی را به طور دستی در آغاز تخلیص اسید نوکلئیک اضافه می‌کنیم. پروب‌های اختصاصی برای HBV DNA با فلوروفور FAM (سبز) لیبل‌گذاری شده است. پروب مخصوص کنترل داخلی با فلوروفور قابل بررسی در کانال VIC (زرد) لیبل‌گذاری شده است.

نگهداری و انتقال نمونه‌ها

در طی انتقال نمونه به دکات ایمنی در مورد انتقال یک پاتوژن توجه کامل مبذول گردد. تا حد امکان زمان انتقال نمونه نباید از شش ساعت تجاوز کند. همچنین حمل و نقل نمونه‌های خون کامل باید در دمای ۲°C+ تا ۸°C+ و نمونه‌های پلاسمای جدا شده در ۲۰°C- صورت گیرد.

نمونه خون گرفته شده باید در اسرع وقت (کمتر از شش ساعت از زمان نمونه‌گیری) پلاسماگیری شود. برای این منظور نمونه خون را به مدت ۲۰ دقیقه در g۱۶۰۰-۱۲۰۰ سانتریفوژ کنید و پلاسمای جدا شده را به میکروتیوب اپندورف استریل منتقل کنید. حساسیت تست در صورت منجمد کردن نمونه خون کاهش خواهد یافت به همین دلیل تا جای ممکن از این امر باید پرهیز گردد. هر چند پلاسمای جدا شده را می‌توان بدون آسیب به ژنوم ویروس برای روزها در ۴°C+، هفته‌ها در ۲۰°C -، و ماه‌ها و حتی سال‌ها در ۷۰°C- نگهداری کرد.

پروتکل

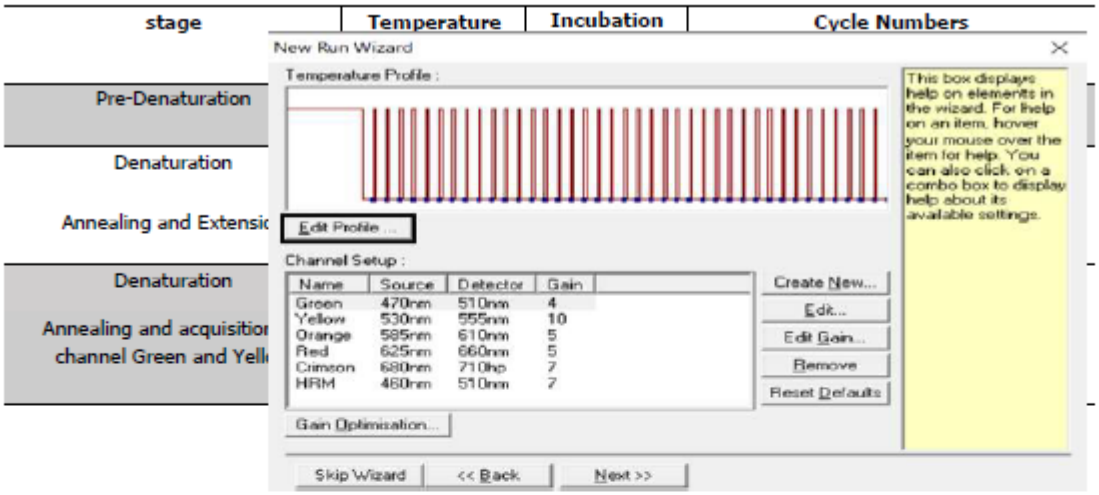


شکل۱: اضافه کردن منظور بررسی واکنش مسترمیکس شامل باشد. برای توضیحات مراجعه کنید.

کنترل داخلی به نمونه در حال تخلیص به PCR. لازم به ذکر است که در حالت بالا Pro HBV Mix و QD-ROMAX, 4X می-بیشتر، به نحوه آماده سازی مسترمیکس

شکل۲: اضافه کردن کنترل داخلی به طور مستقیم به مسترمیکس. باید توجه شود در این حالت هیچ گونه کنترلی بر روی مرحله تحلیص دخواهد بود. لازم به ذکر است که در حالت بالا مسترمیکس شامل Pro HBV Mix و QD-ROMAX, 4X می‌باشد. برای توضیحات بیشتر، به نحوه آماده سازی مسترمیکس مراجعه کنید.

جدول ۶: برنامه دمایی هر قسمت در جدول زیر آورده شده است.

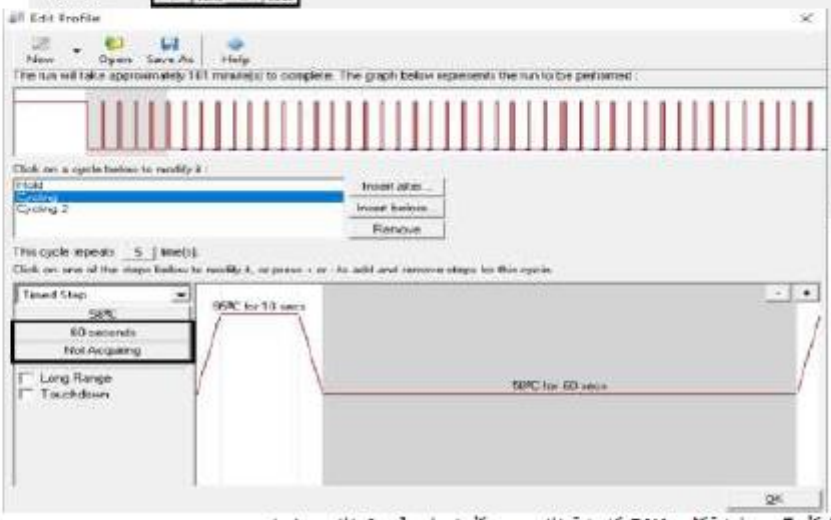


به منظور انجام تست باید برنامه دمایی بالا جدول (۶) برای دستگاه تعریف شود و مطابق با شکل‌های زیر انجام شود. سنجش طیف نشری (acquisition) باید هم درکانال سبز (مربوط به سیگنال دریافتی از ژنوم HBV) و هم درکانال زرد (مربوط به سیگنال دریافتی از کنترل داخلی) انجام شود. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه Rotor Gene به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. علاوه بر تعریف دمایی دستگاه که در قسمت بالا آمده است دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم گردد. از همین رو پس از تنظیم دمایی دستگاه و معرفی کانال‌های سبز و زرد باید به قسمت تنظیم مقدار نشر فلورسانس (Gain optimization) مراجعه کنید. سپس با کلیک بر روی (optimize acquiring) و کلیک ok بر روی پنجره‌های باز شده ۲ کانال سبز و زرد به لیست صفحه اضافه می‌شود. با قرار دادن دما بر روی ۵۸ درجه سانتیگراد کلید start را فشار دهید. در این حالت کلیه نمونه‌ها باید در دستگاه چیده شده باشد. دستگاه پس از شروع و رسیدن آن به دمای ۵۸ دو کانال را برای شدت فلورسانس تنظیم کرده و completed را نشان می‌دهد. در این حال دکمه close صفحه را فشار دهید. گزینه close را دوباره انتخاب کنید. در صفحه بعد امکان شروع کامل دستگاه فراهم است. علاوه بر این اطلاعات مربوط به تنظیم شدت فلورسانس به صورت خودکار در این مرحله نهایی قابل رویت می‌باشد. روش برنامه کار در شکل‌های زیرآورده شده است.

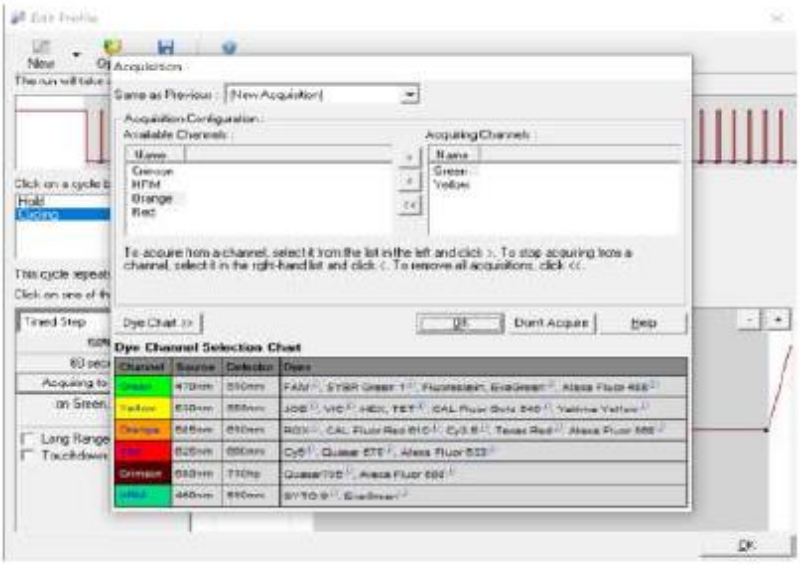
- بعد از بازکردن نرم افزار Rotor-Gene پنجره "New Run Wizard" ظاهرمی‌شود با زدن گزینه Next و رسیدن به دکمه "Edit Profile" برنامه دمایی را اجراء می‌کنیم (شکل ۱ تا ۸).

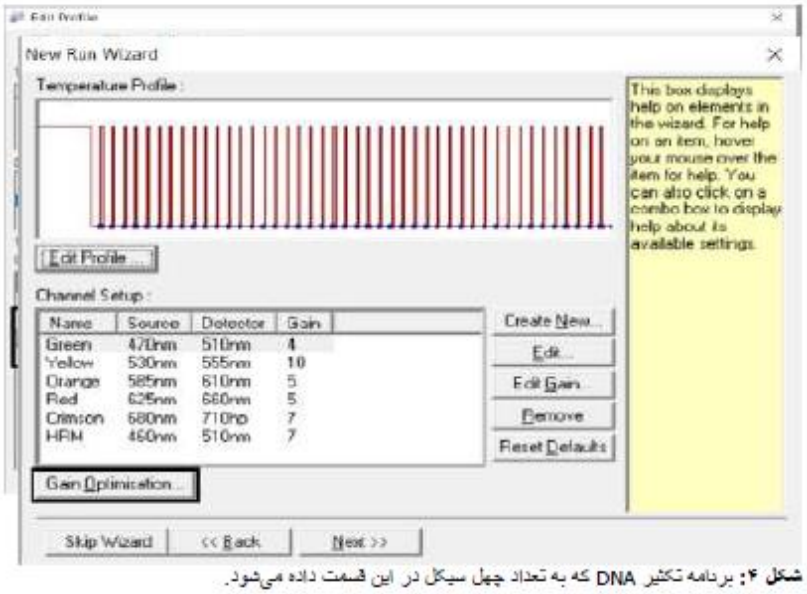
شکل ۱: ویرایش نمایی از گزینه "Edit Profile" انجام می‌شود.

شکل ۲: برنامه فعال شدن آنزیم Hot-start enzyme در این قسمت انجام می‌شود.



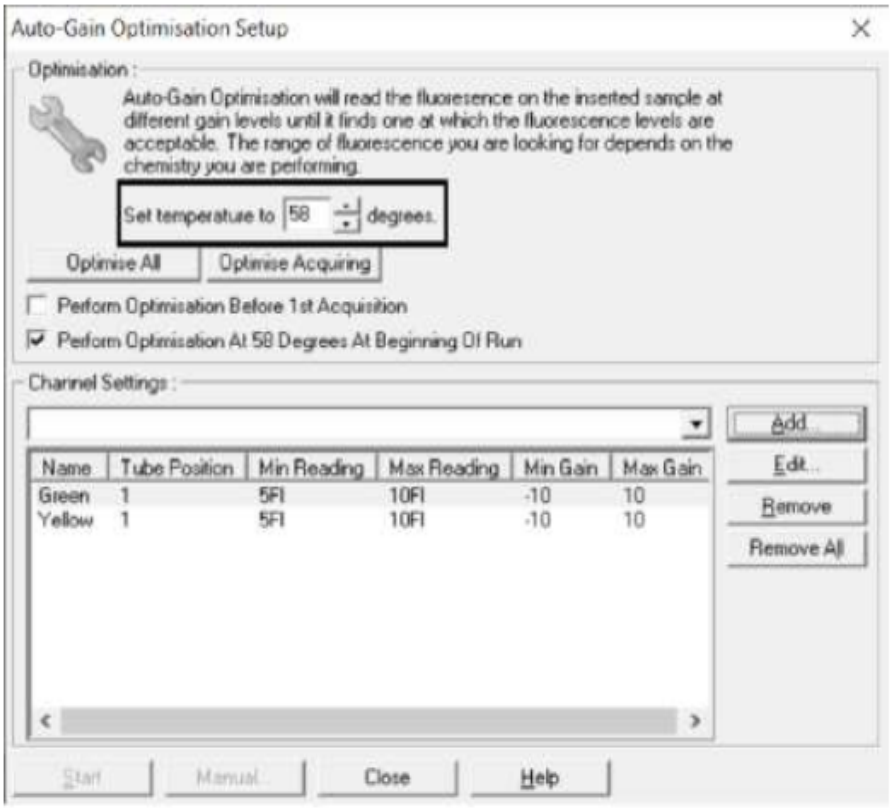
شکل ۳: برنامه تکثیر DNA که به تعداد پنج سیکل در این قسمت داده می‌شود.





شکل ۴: برنامه تکثیر DNA که به تعداد چهل سیکل در این قسمت داده می‌شود.

شکل ۵: در این قسمت کانال‌های دستگاه برای رنگ سبز و زرد انتخاب می‌شود.



شکل ۶: محدوده تشخیص کانال‌های فلورسانس باید با توجه به شدت فلورسانس در لوله‌های PCR تعیین شود. روی گزینه "Gain Optimization" در کادر "New Run Wizard" کلیک کنید تا کادر "Auto-Gain Optimization Setup" باز شود. دمای کالیبراسیون را روی ۵۸ تنظیم کنید تا با دمای اتصال پرایمرهای برنامه تکثیر مطابقت داشته باشد.

شکل ۷: تنظیم حساسیت کانال فلورسانس. توجه داشته باشید که در نرم افزار Rotor Gene 3000 رنگ‌های فلورسانس را " FAM/Sو JOE انتخاب کنید.

- در آخرین پنجره "New Run Wizard" روی "شروع اجرا" کلیک کنید.

شکل ۸: شروع برنامه. توجه داشته باشید که در نرم افزار Rotor-Gene 3000، رنگ‌های فلورسانس را "FAM/Sybr" و "JOE" تعریف شده است.

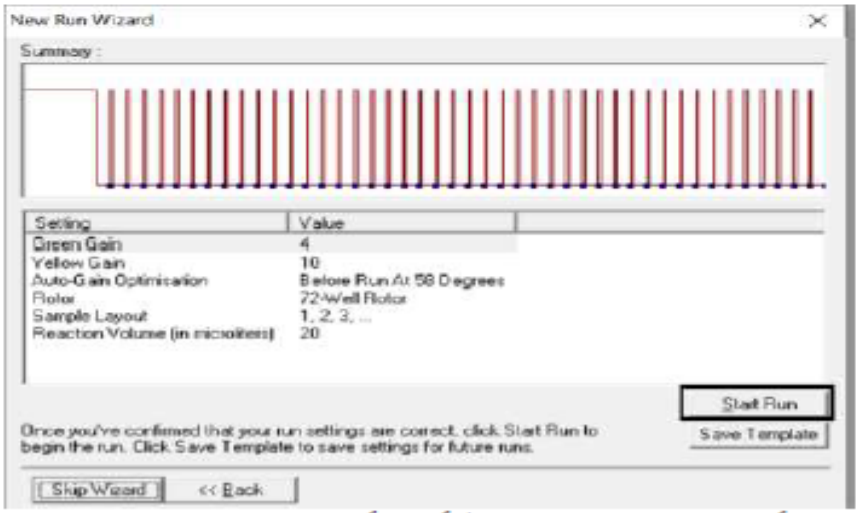
تفسیر نتایج

استانداردهای تامین شده در این کیت معادل یک نمونه تخلیص شده با تعداد کپی ویروس کاملا مشخص است. از آنجا که از هر نمونه تخلیص شده مقدار ۱۰µl از ژنوم تخلیص شده با ۱۵µl از مسترمیکس مخلوط می‌شود باید همین روند به طور مشابه برای نمونه‌های استاندارد نیز اعمال گردد. برای ترسیم منحنی استاندارد هر پنج استاندارد تامین شده در کیت باید در هر بار انجام تست به همراه نمونه‌های مجهول مورد آنالیز قرار گیرد تا بتوان به واسطه منحنی استاندارد کشیده شده تعداد کپی ویروس در نمونه‌های مجهول تعیین گردد. برای انجام این امر باید استانداردها به عنوان استاندارد در دستگاه Rotor Gene تعریف شوند و مقدار معادل استاندارد بر اساس فرمول زیر محاسبه شده و به نرم افزار دستگاه وارد شود.

استانداردهای تامین شده در کیت به صورت IU/µl می‌باشد. برای تبدیل این استانداردها به IU/ml از رابطه زیر استفاده کنید.

$$\text{نتیجه}^{4}(\text{IU/ml}) = \frac{\text{نتیجه}\left(\frac{\text{IU}}{\mu\text{l}}\right) \times \text{حجم الوشن}(\mu\text{l})}{\text{حجم نمونه تخلیص شده}\ (\text{ml})}$$

اگر مقدار نمونه پلاسمای اولیه ۲۰۰ میکرولیتر و حجم الوشن ۵۰ میکرولیتر باشد، استاندارد اول [Std1 (1×10^{6} IU/µL)] دارای لود ویروسی 2.5×10^{7} IU/ml خواهد بود. عدد اخیر به عنوان استاندارد اول Rotor Gene تعریف می‌گردد تا نمونه‌ها بر اساس IU/ml قابل گزارش گردند.



تعیین صحت یک ران PCR

یک ران PCR برای تشخیص، زمانی قابل تایید است که:

شامل شرایط کنترل زیر باشد:

جدول ۷: نمونه‌های کنترل برای یک ران PCR قابل قبول

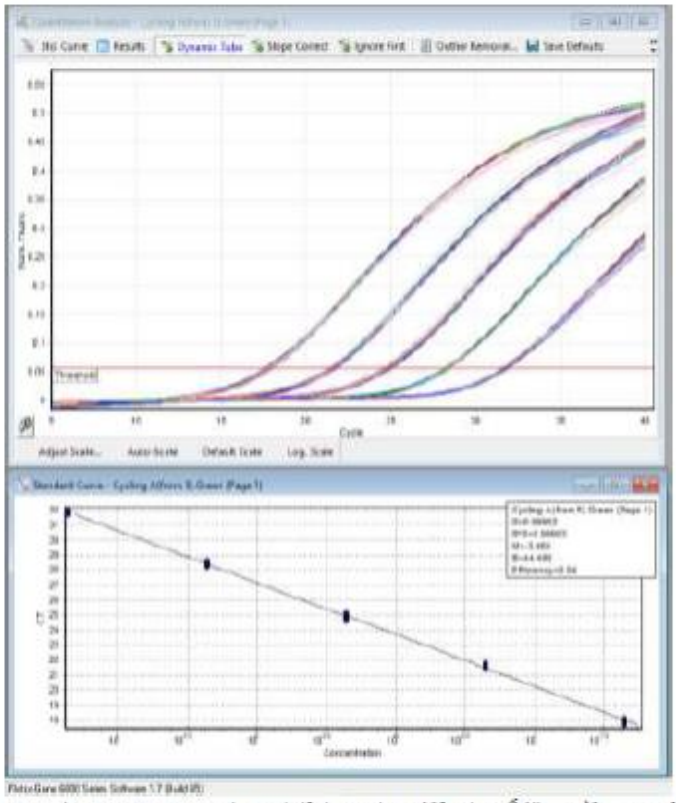
کنترل	کانال شناسایی کننده	
	FAM™ (HBV target)	VIC™ (Internal Control)
استاندارد کمی (استاندارد/ مثبت)	+	مورد قبول نیست
کنترل منفی NTC	-	+

منحنی استاندارد رسم شده دارای پارامترهای زیر باشد:

جدول ۸: پارامترهای کنترل کننده نمودار استاندارد

پارامترهای کنترل کننده	مقادیر معتبر
R square (R2)	≤۰/۹۸

پارامتر کنترل منحنی استاندارد در زیر نمودار منحنی استاندارد در پنجره تجزیه و تحلیل نمایش داده می‌شود



شکل ۹: در شکل بالا گراف تکثیر برای هر استاندارد مشاهده می‌شود. همچنین بازده، عرض از مبدا و ضریب همبستگی واکنش مشاهده می‌شود.

محدودیت‌ها

تمامی مواد موجود در کیت باید منحصراً در تشخیص In vitro به کار برده شوند. این محصول باید توسط پرسنلی استفاده شود که آموزش‌های لازم جهت کار در بخش مولکولی را دیده باشند. پیروی اکید از راهنمای استفاده از کیت برای نیل به نتایج بهینه PCR ضروری است. باید به تاریخ‌های انقضای چاپ شده بر روی جعبه توجه گردد و اجزای منقضی شده را از رده مصرف خارج نمود.

آزمایش‌های ارزیابی و معتبرسازی

سنجش عملکرد

ارزیابی عملکرد Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit با استفاده از استانداردهای بین المللی برای روش‌های تشخیص مبتنی بر تکثیر اسیدنوکلئیک برای HBV DNA (کد Acrometrix: 625607) انجام شد و مواد استاندارد HBV (پلاسمیدهای تهیه شده) طبق استانداردهای بین المللی Acrometrix سنجیده شد.

انتخاب ژن مورد هدف و طراحی پرایمر و پروب

ابتدا تمام توالی‌های ثبت شده مربوط به ویروس HBV از پایگاه‌های داده معتبر نظیر NCBI دریافت می‌شود سپس یک Databank برای این ویروس تهیه می‌شود. سپس با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی نظیر Mega7 و Claustal W آنالیزهای همردیفی صورت گرفته و بهترین منطقه از این ژن‌ها که حفاظت شده تر باشند جهت طراحی پرایمر و پروب با نرم افزارهایی مانند AlleleID 7.5 و Beacon Designer انتخاب می‌شوند. پس از طراحی پرایمر و پروب اختصاصیت آنها و خصوصیات و ویژگی هر کدام با نرم افزارهای NCBI blast،Generunner و Oligo7 ارزیابی می‌شوند.

تهیه یک نمونه استاندارد

ارزیابی عملکرد کیت Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit با استفاده از استانداردهای ValiQuant HBV DNA Quantification Panel (Acrometrix) در روش‌های تشخیص مبتنی بر تکثیر اسیدنوکلئیک برای HBV DNA (کد Acrometrix: 625607) انجام شد و مواد استاندارد HBV (پلاسمیدهای تهیه شده) طبق استانداردهای بین المللی Acrometrix سنجیده شد. نتایج در جدول زیر مشاهده می‌شود.

جدول ۹: نتایج ارزیابی عملکرد Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit با استفاده از استانداردهای Acrometrix:

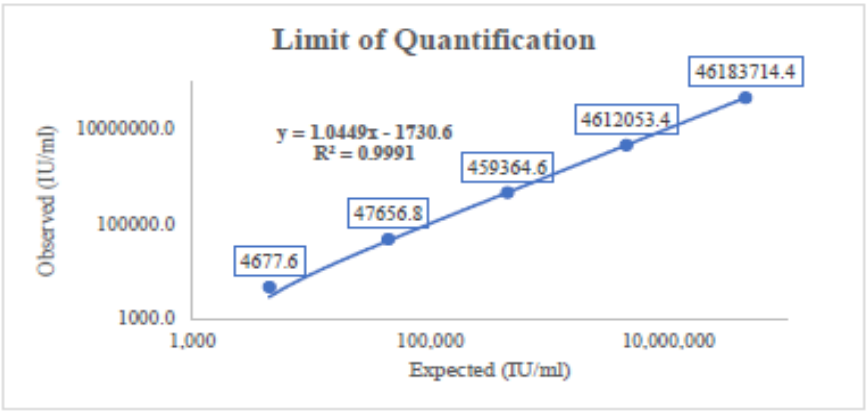
آزمایش برای تشخیص ویروس هپاتیت B (Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit)با استفاده از کیت	Viral load [IU/mL]	میانگین Ct سه تکرار واکنش
	2,000,000	23.94
	200,000	27.57
	20,000	31.16
	2,000	34.81
	2,00	37.18

حد کمیت (Limit of Quantification)

حدی است که در آن می‌توانیم به طور منطقی اختلاف بین ۲ مقدار مختلف را تشخیص دهیم و یا تعیین کمترین مقدار از غلظت یک آنالیت که با دقت و صحت قابل قبولی سنجیده شود. برای این منظور از ۵ غلظت استاندارد (۴۴۲۰۰۰۰۰ تا ۴۴۲۰ IU/ml) هر کدام ۱۴ تکرار گذاشته شد که نتایج در جدول زیر قابل مشاهده می‌باشد. نتایج حد کمی شدن که نشان می‌دهد کیت Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit تا غلظت 4420 IU/ml با دقت و صحت قابل قبول می‌تواند کمی باشد

جدول ۱۰: نتایج آزمایش‌های حد کمیت

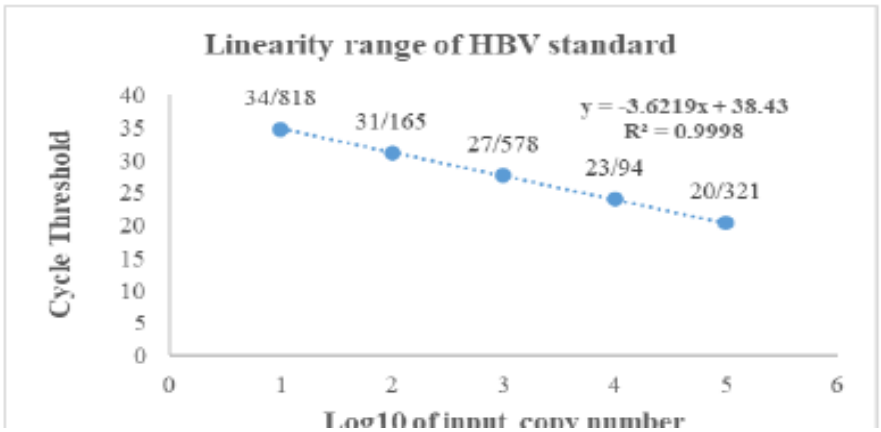
HBV DNA Calibrator	Expected Results (IU/ml)	Mean of three runs for each concentration	CV of three runs for each concentration
Neg	0	0	N/A
E1	4,420	4677.6	4.0
E2	44,200	47656.8	6.1
E3	442,000	459364.6	1.7
E4	4,420,000	4612053.4	2.4
E5	44,200,000	46183714.4	3.6



شکل ۱۰: حد کمیت برای کنترل داخلی

خطی بودن

یک خاصیت مهم کیت بوده که برای اندازه‌گیری در محدوده‌ای از غلظت‌ها استفاده می‌شود. ویژگی یک رابطه است؛ به این معنی که می‌توان آن رابطه را در شکل نموداری به صورت یک خط مستقیم نشان داد.



شکل ۱۱: محدوده خطی بودن برای کنترل داخلی

کمترین حد تشخیص (LoD) حساسیت آنالیتیکال

برای تعیین LoD از استاندارد بنجم Acrometrix که دارای بار ویروسی ۲۰۰ IU/ml می‌باشد رقت‌های۴۰ IU/ml، ۲۰، ۱۰ در ماتریکس واقعی (پلاسما) تهیه شد. سپس این نمونه‌ها با استفاده از کیت جداسازیِ DNA (کیت تخلیص DNJia Virus DNA Kit) تخلیص شدند.

از مطالعات LoD برای تعیین کمترین غلظت قابل تشخیص ژنوم ویروس HBV استفاده شد، که در آن تقریباً ۹۵٪ از کل نمونه‌ها (مثبت واقعی) نتیجه مثبت را تکرار کردند (آزمایش با ۲۰ تکرار از هر رقت بعد از استخراج استفاده شد). طبق دستورالعمل FDA کمترین حد تشخیص یا LoD باید تعداد جواب مثبت از هر رقت ۱۹/۲۰ تکرار باشد. از نمونه‌های تهیه شده ۲۰ تکرار از هر رقت گذاشته شد و نتایج زیر بدست آمد.

جدول ۱۱: این جدول نتایج کمترین حد تشخیص یا LOD را برای رقت‌های۴۰ IU/ml، ۲۰ و ۱۰ با ۲۰ تکرار برای شناسایی ویروس HBV نشان می‌دهد.

شماره تست	غلظت (IU/mL)		
	HBV		
	40	20	10
1	41.95	44.53	Undetermined
2	43.9	44.92	Undetermined
3	39.11	40.59	Undetermined
4	41.26	Undetermined	Undetermined
5	41.29	Undetermined	44.9

6	43.59	Undetermined	43.36
7	42.59	Undetermined	Undetermined
8	43.08	Undetermined	Undetermined
9	42.73	Undetermined	Undetermined
10	43.21	42.51	43.48
11	40.71	41.38	43.01
12	41.0	Undetermined	Undetermined
13	43.23	Undetermined	Undetermined
14	40.59	Undetermined	Undetermined
15	40.54	42.54	Undetermined
16	42.51	44.0	44.23
17	40.55	Undetermined	43.5
18	43.25	Undetermined	Undetermined
19	43.44	Undetermined	Undetermined
20	40.21	Undetermined	Undetermined
درصد مثبت در هر غلظت	100%	35%	30%

کمترین حد تشخیص در کیت Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit برابر ۴۰ IU/ml می‌باشد.

حساسیت آنالیتیکال

مجموعه پرایمر/پروب مورد استفاده در کیت تشخیصیViga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit در in-silico برای توالی‌های HBV در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل هم ردیفی (Alignment) توالی‌های پرایمر/پروب برای HBV ۱۰۰٪ هم پوشانی را با توالی‌های HBV نشان داد. نتایج هم ردیفی در جدول زیر نشان داده شده است.

جدول ۱۲: نتایج آنالیز in-silico برای پرایمر/پروب ویروس HBV در برابر توالی‌های گزارش شده HBV در سایت NCBI

Strain	Target	Accession	% Homology Test	% Homology Test	% Homology

			Forward primer%	Reverse primer%	Test Probe%
Hepatitis B virus isolate EG7207	HBs-Ag	MW784518.1	100	100	100
Hepatitis B virus OM-AHB	HBs-Ag	LC592170.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate SEN-WS300633	HBs-Ag	MW567980.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate GMB-EG9060	HBs-Ag	MW567973.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate NG/HBV/BD-021	HBs-Ag	MN819062.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate NG/HBV/PH-069	HBs-Ag	MN819056.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate NG/HBV/SD-106	HBs-Ag	MN819055.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate 8990	HBs-Ag	MN845924.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate 3448	HBs-Ag	MN845908.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate 2920	HBs-Ag	MN845902.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate 9-HBV2	HBs-Ag	MW234358.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate 2-HBVA	HBs-Ag	MW234356.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate 2-hbvD	HBs-Ag	MW234355.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate HD-18-098	HBs-Ag	MN996914.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate HD-18-094	HBs-Ag	MN996913.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate P3_D0	HBs-Ag	MW082640.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate coThai1	HBs-Ag	MT111596.1	100	100	100
Hepatitis B virus isolate I9	HBs-Ag	MN562231.2	100	100	100
Hepatitis B virus isolate I4	HBs-Ag	MN562226.2	100	100	100

همانطور که در جدول بالا مشاهده می‌شود آنالیز هم ردیفی (Alignment) توالی‌های پرایمر/پروب برای ویروس HBV در سایت NCBI نرم افزار nBLAST دارای ۱۰۰٪ هم پوشانی با توالی‌های HBV نشان می‌دهد.

حساسیت بالینی

تعداد ۹۴ نمونه مثبت از نظر ویروس HBV با بار ویروسی بالا، متوسط و پایین (Ct 14-40) که با کیت AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 (Altona) مورد آزمون قرار گرفته بود با کیت Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit

(ROJETechnology) نیز آزمون انجام و تعداد ۹۲ نمونه مثبت شد که حساسیت برابر۹۷/۸۷٪ را نشان می‌دهد. همچنین با استفاده از یک نمونه منفی (پلاسما) رقت‌های ۴۰۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۴۰۰ IU بر میلی لیتر (3log10> LOD, 2log10> LOD, 1log10> LOD)ار نمونه کنترل تهیه شد، سپس نمونه‌ها تخلیص و آزمایش با استفاده از کیت تشخیصی Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit (ROJETechnology) بصورت ده بار تکرار بررسی شد.

جدول ۱۳: نتایج آزمون حساسیت کلینیکال کیت تشخیصی Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit (ROJETechnology) در جدول زیر می‌باشد.

رقت تهیه شده	نوع نمونه	غلظت نمونه	Ct
3log10> LOD	پلاسما	۴۰,۰۰۰میلی‌لیتر IU	31.07
			30.83
			30.96
			30.68
			30.79
			30.99
			30.75
			30.96
			30.88
			30.92
2log10 > LOD	پلاسما	۴۰۰۰IUمیلی‌لیتر	34.19
			34.34
			34.47
			34.3
			34.52
			34.21
			34.46
			34.7
			34.56
			34.56
1log10 > LOD	پلاسما	۴۰۰IUمیلی‌لیتر	38.44
			38.21
			38.57
			38.69
			38.38
			38.52
			38.50
			38.49
			38.25
			38.54

همانطور که در جدول مشـــاهده می‌شـــود نتایج بعد از اســـتخراج برای تمام نمونه‌ها از 3log10> LOD تا 1log10> LOD مثبت می‌باشد.

واکنش متقاطع (ویژگی آنالیتیکال)

این آزمایش برای کیت Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit بصورت in-Silico برای سایر پاتوژن‌ها بررسی شـــد. تجزیه و تحلیل هم ردیفی (Alignment) توالی‌های پرایمر/پروب برای ویروس HBV در پایگاه داده NCBI در بانک nr/nt با استفاده از نرم افزار BLASTN 2.10.0+ نشان داد که این پرایمر/پروب فقط توالی‌های ویروس HBV را شناسایی می‌کند. بر اساس این تجزیه و تحلیل هیچ واکنش متقاطعی برای سایر پاتوژن‌ها در جدول زیر مشاهده نشد. برای مواردی که هومولوژی بالاتر از ۸۰٪ داشتند تست Real Time-PCR با کیت (Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit) گذاشته شد.

جدول ۱۴ : نتایج in-Silico پرایمر/پروب کیت Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit برای سایر پاتوژن‌ها

Pathogen (Taxonomy ID)	Strain	Target	GenBank Acc#	% Homology Test FP	% Homology Test RP	% Homology Test Probe
Human immunodeficiency virus	R1041_QCL27_Enr_CE	HBs-Ag	MK512792.1	63%	58%	52%
Hepatitis C virus subtype 1a	HCV-1a/US/BID-V324/2001	HBs-Ag	EU256097.1	45%	58%	44%
HSV-1	DOCK8	HBs-Ag	MN401207.1	54%	64%	56%
Human papillomavirus	HPV-mSK_091	HBs-Ag	MH777234.1	63%	52%	44%
HSV-2	SYD-SCT1	HBs-Ag	MT044485.1	59%	64%	64%
Mycoplasma genitalium	M2288	HBs-Ag	CP003773.1	45%	41%	36%
Chlamydia trachomatis	tet9	HBs-Ag	CP035484.1	90%	58%	52%
Streptococcus agalactiae	Sag27	HBs-Ag	CP031556.1	90%	58%	64%
Human T-cell leukemia virus type I	IR (26)	HBs-Ag	MN453013.1	36%	47%	68%

Human gammaherpesvirus	NPCT115	HBs-Ag	MK540470.1	54%	52%	60%
Human alphaherpesvirus	KPZ13-372	HBs-Ag	MH709376.1	68%	88%	72%
Human T-lymphotropic virus 2	BRSP56501-15	HBs-Ag	KY928507.1	31%	47%	36%
Human parvovirus B19	C39 NS1	HBs-Ag	DQ293995.2	40%	52%	36%
JC polyomavirus	JCV255-01	HBs-Ag	JF425441.1	41%	40%	32%
Neisseria gonorrhoeae	TUM15748	HBs-Ag	AP023071.1	81%	58%	64%
Trichomonas vaginalis	TVAG_228310	HBs-Ag	XM_001580504.1	54%	64%	48%

واکنش متقاطع (ویژگی بالینی)

همچنین برای بررسی ویژگی بالینی اسید نوکلئیک پاتوژن‌ها در ماتریس نمونه منفی (پلاسما) با غلظت خاص رقیق شد و سپس نمونه ها تخلیص و آزمایش با استفاده از کیت (Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit) بررسی شد، هیچ واکنش متقاطع برای سایر پاتوژن‌ها در جدول زیر مشاهده نشد.

جدول ۱۵: بررسی واکنش متقاطع ویروس HBV با کیت (Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit)

Virus/Bacteria/Parasite	Source/ Sample type	Ct Value (ORF1ab gene/N gene)
Human immunodeficiency virus-1	Clinical sample	-/-
Hepatitis C virus	Clinical sample	-/-
Cytomegalovirus	Clinical sample	-/-
Herpes simplex virus type 1	Clinical sample	-/-
Herpes simplex virus type 2	Clinical sample	-/-
Human papillomavirus	Clinical sample	-/-
Epstein-Barr virus	Clinical sample	-/-
Adenovirus	Clinical sample	-/-

Influenza A	Clinical sample	-/-
Influenza B	Clinical sample	-/-
Legionella pneumophila	Clinical sample	-/-
Cryptococcus neoformans	Clinical sample	-/-
Chlamydia pneumonia	Clinical sample	-/-
Streptococcus pneumoniae	Clinical sample	-/-
Respiratory Syncytial Virus	Clinical sample	-/-
Mycoplasma pneumoniae	Clinical sample	-/-
Streptococcus pyogenes	Clinical sample	-/-
Mycobacterium tuberculosis	Clinical sample	-/-
10 Pooled human genomes	Clinical sample	-/-

همانطور که در جدول بالا مشاهده می‌شود نمونه‌های ژنوم (RNA, DNA) از نمونه‌های بالینی تهیه شد و آزمون اختصاصیت یا ویژگی با استفاده از کیت Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit انجام شد، که نتایج تمام آنها منفی شد که نشان دهنده عدم اتصال پرایمر و پروب‌های اختصاصی به میکروارگانیسم‌های دیگر می‌باشد.

دقت

ارزیابی دقت، شامل تکرارپذیری و تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی می‌باشد.

تکرارپذیری درون ران

Intra-assay (درون سنجی) به دقت و توانایی روش طراحی شده در تعیین علظت تکرارهای مشابه در یک سیکل Real Time-PCR اشاره دارد که بصورت SD برای Ct های مختلف نشان داده می‌شود. برای این منظور ۱۴ تکرار از هر علظت استاندارد در یک واکنش کاری مورد بررسی قرار گرفت و مقادیر ضریب تغییرات (CV) برای مقادیر سیکل آستانه (Ct)، محاسبه شد. که نتیجه واکنش در بیشترین مقدار ضریب تغییرات ۰/۷۴ و کمترین مقدار ضریب تغییرات ۰/۴۲ می‌باشد. کلیه نتایج قابل قبول باید CV کمتر از ۵٪ داشته باشد.

جدول ۱۶: نتایج آزمایش‌های تکرارپذیری درون ران

Standard	Mean of each run	SD of each run	CV of each run
Std1	20.20214286	0.122422884	0.605989599
Std2	23.635	0.100747208	0.426262781

Std3	27.67071429	0.164759232	0.595428184
Std4	31.80142857	0.173243144	0.544765287
Std5	35.46357143	0.265115567	0.747571539

تجدیدپذیری

Inter-assay (میان سنجی) به اختلافات موجود در نتایج بین ران‌های مختلف واکنش Real Time-PCR یا نتایج حاصل از آزمایشگاه های مختلف اشاره دارد و معمولاً بصورت SD یا CV مربوط به تعداد کپی‌ها یا غلظت‌های مختلف از یک نمونه بیان می‌شود. برای این منظور واکنش Real Time-PCR برای ۵ غلظت استاندارد با ۱۴ تکرار از هر استاندارد در سه روز مختلف انجام شد. که نتیجه واکنش در بیشترین مقدار ضریب تغییرات ۱/۷۶ و کمترین مقدار ضریب تغییرات ۰/۳۵ می‌باشد. کلیه نتایج قابل قبول باید CV کمتر از ۱۰٪ داشته باشند.

جدول ۱۵: نتایج آزمایش‌های تجدیدپذیری

Standard	Mean of three runs	SD of three runs	CV of three runs
Std1	20.32166667	0.119286427	0.586991358
Std2	23.94047619	0.265630107	1.109543958
Std3	27.57833333	0.096683086	0.350576246
Std4	31.165	0.551441062	1.769424232
Std5	34.81857143	0.559704277	1.607487768

ارزیابی بالینی

عملکرد بالینی کیت Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit با استفاده از ۱۹۴ نمونه پلاسما از بیمارانی که مشکوک به هپاتیت B بودند جمع‌آوری شد. برای مقایسه و بررسی صحت کیت تشخیصی (Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit) از کیت AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 (Altona) استفاده شد. هر دو روش بر روی دستگاه Real Time-PCR (Rotor-Gene Q-Qiagen) اجراء شد. نتایج براساس کیت مرجع AltoStar® HBV PCR Kit 1.5(Altona) بدین صورت بدست آمد که ۱۰۰ نمونه منفی و ۹۴ نمونه مثبت شد. ارزیابی بالینی بین کیت Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic

Kit و AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 (Altona) . نتایج (میزان توافق نتایج منفی) NPA ۱۰۰ % و (میزان توافق نتایج مثبت) PPA ۹۷/۸۷ % در جدول زیر نشان داده شده است.

جدول ۱۶: نتایج آزمایش‌های حساسیت بالینی

Test		AltoStar® HBV PCR Kit 1.5 (Altona)		Total
		Positive	Negative	
Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit	Positive	92	0	92
	Negative	2	100	102
Total		94	100	194

- Positive Agreement Rate: ۹۲/ ۹۴x%۱۰۰= ٪۹۷/۸۷
- Negative Agreement Rate: ۱۰۰/۱۰۰x%۱۰۰= ٪۱۰۰
- Overall rates of agreement: (۹۲+۱۰۰) / (۹۲+۰+۱۰۰+۲) x%۱۰۰= %۹۸/۹۶

نمادها

جدول ۱۷: نمادها روی لیبل کیت

نمادها	معنی	نمادها	معنی
	دمای نگهداری		آدرس کارخانه
LOT	سری ساخت محصول		تاریخ تولید

IVD	In Vitro Diagnostics		تاریخ انقضا
		REF	شماره کاتالوگ محصول

عیب‌یابی

در این قسمت تلاش می‌شود تا بیشتر مشکلاتی که حین کار ممکن است برای کاربر رخ دهد بررسی شود و راه حل‌های پیشنهادی برای رفع آن عنوان گردد. هم چنین محققین بخش پشتیبانی روزه مشتاق هستند تا به تمام سوالات شما پاسخ دهند. در صورت احتیاج حتما با بخش پشتیبانی روزه تماس حاصل فرمایید.

مشاهدات	دلیل احتمالی	راه حل
• منحنی کنترل منفی افزایش شدت فلورسانس را نشان دهد (یک مثبت کلاب اتفاق می افتد).	• آلودگی نمونه ممکن است اتفاق افتاده باشد.	• ران و آزمایش انجام شده نامعتبر می‌باشد و با رعایت دقیق دستورالعمل‌های کیت، آزمایش را تکرار کنید.
• کنترل داخلی برای نمونه هیچ منحنی افزایش شدت فلورسانسی را نشان نمی‌دهد و برای نمونه منفی می‌باشد.	• عدم شناسایی ژن کنترل داخلی	• راه اندازی و اجرای روش نادرست می‌باشد. • اشکال در عملکرد معرف یا تجهیزات • استخراج نامناسب اسید نوکلئیک از نمونه و در نتیجه از دست دادن اسیدنوکلئیک یا وجود بازدارنده‌های PCR در نمونه‌های بالینی • عدم وجود سلول انسانی کافی در نمونه برای تکثیر در واکنش PCR
• افزایش شدت سیگنال فلورسانس نمایش حالت یا شکل S را نشان نمی‌دهد.	• کیفیت پایین نمونه‌های DNAتخلیص شده • خرابی تجهیزات، دستگاه Real Time-PCR	• دوباره آزمایش را با DNA استخراج شده تکرار کنید. • استخراج DNA را با یک کیت معتبر تکرار کنید. • DNA استخراج شده را به نسبت ۱/۱۰ رقیق کنید. • آزمایش را تکرار کنید یا با تامین کننده تجهیزات تماس بگیرید.

اطلاعات سفارش

گروه محصول	نام محصول	شماره کاتالوگ	تعداد واکنش
کیت‌های تشخیص مولکولی	Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit	MD003055	100 Preps
کیت‌های تشخیص مولکولی	Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit	MD003056	25 Preps
محصولات مرتبط	DNall VirAll Kit	DN983053	100 Preps

پشتیبانی فنی

روزه تکنولوژی رضایت کامل شما را تضمین می‌کند. تیم پشتیبانی تخصصی روزه از محققین متخصص آموزش دیده تشکیل شده است که قادر به حل بیشتر مشکلات شما هستند. تیم پشتیبانی تخصصی ما قادر به راهنمایی شما برای انتخاب محصول مناسب است.

منابع

- ValiQuant® HBV DNA Quantification Panel (Acrometrix). P/N 50-0150-Revision:20081009
- WHO Handbooks for Guideline Development 2nd edition 2019, Developing guideline recommendations for tests or diagnostic tools.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Pierson-Perry, J. et al. (2009), "Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents: Approved Guideline", CLSI EP25-A