HBV qPCR Detection Kit

دفترچه راهنما برای سنجش کمی ویروس هپاتیت ب در سرم یا پلاسما

با استفاده از روش

Real-time PCR

قابلیت استفاده برای دستگاه های :

Applied Biosystems® - StepOne/ StepOnePlus

Applied Biosystems® - 7500 Fast/7900HT

Qiagen Rotor-Gene® - Q/ 3000/ 6000

LightCycler® - 96/480

QuantStudio™ - 5/6

Cobas® - 4800/ z480

Bio-Rad® - CFX iQ5/96

Tianlong Real-time PCR

موارد استفاده تحقیقاتی

Research Use Only

In vitro Use Only

- **مقدمه**

در این کیت تشخیص ویروس هپاتیت ب (ژنوتایپ های A-H) از طریق تکثیر قطعه ی 170 جفت بازی محافظت شده در ژنوم ویروس صورت می گیرد. در طی فرآیند PCR، افزایش تابش فلورسانس ناشی از تکثیر ناحیه هدف در ژنوم ویروس با استفاده از کانال سبز (FAM) سنجیده می شود. این کیت حاوی کنترل داخلی بوده که به کمک آن می توان وجود عوامل مهار کننده ی واکنش PCR ، کارآیی واکنش و صحت فرآیند استخراج را ارزیابی کرد. آشکارسازی تکثیر کنترل داخلی از طریق کانال زرد (HEX) انجام می شود. استفاده از مسترمیکس و استانداردهای موجود در کیت امکان تشخیص کمی ویروس را با حساسیت بالا امکان پذیر می سازد.

- **اقدامات و هشدارهای ایمنی زیستی**

کارکنان باید با پروتکل و ابزارهای مورد استفاده آشنا باشند.

هنگام کار با نمونه های بالینی، از وسایل محافظ شخصی (مانند لباس، دستکش، شیلد، عینک محافظ) استفاده کنید.

کلیه مراحل آماده سازی و کار با نمونه بایستی در فضای BSL2 یا سطوح ایمنی زیستی بالاتر و در زیر هود بیولوژیکی کلاس II انجام شود.

کنترل های مثبت و کلیه نمونه های بیمار باید به عنوان نمونه های عفونی در نظر گرفته شده و مراحل غیرفعالسازی ویروس و نیز امحاء نمونه باید مطابق با پروتکل های دفع و امحاء نمونه های عفونی بیولوژیک انجام شود.

از خوردن، آشامیدن، سیگار کشیدن، استعمال لوازم آرایشی و استفاده از لنزهای تماسی در تمام فضاهای آماده سازی نمونه و آزمون جدا خودداری نمایید.

هنگام استفاده از کیت، به تاریخ انقضاء چاپ شده بر روی جعبه کیت توجه نموده و از محصول منقضی شده استفاده نکنید.

از صحت نصب، کارکرد و کالیبراسیون تمام ابزارهای مورد استفاده اطمینان حاصل کنید.

در هنگام کار با کیت مواد و میکروتیوب های واکنش Real-time PCR ، از دستکش بدون پودر استفاده کرده و آن ها را بر روی یخ و یا رک های خنک کننده قرار دهید.

بلافاصله پس از استفاده از کیت، آن را در شرایط بهینه درج شده بر روی جعبه کیت منتقل کرده و نگهداری نمایید.

- **نمونه های قابل قبول برای آزمون**

نمونه های سرم و پلاسما برای انجام آزمون مورد تایید می باشد.

- **شرایط نگهداری نمونه ها**

نمونه ی پلاسما و سرم باید در لوله های استریل حاوی EDTA جمع آوری شود. مواد باید در مدت 24 ساعت در دمای بین 2+ تا 8+ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل شوند. نمونه ی پلاسمای جدا شده در دمای زیر 20- درجه سانتی گراد چندین هفته پایدار بوده و تیتر ویروس در آن ثابت می ماند. حداقل نمونه ی مورد نیاز برای آزمایش100 میکرولیتر پلاسما می باشد.

- **محدودیت های روش تشخیصی**

شرایط نگهداری و انتقال نمونه در نتایج آزمایش این کیت موثر است. شرایط نادرست نگهداری معرف های آزمایش و نمونه ها، وجود عوامل مهارکننده در واکنش آزمون، آلودگی های خارج از کنترل به وجود آمده در طی پردازش نمونه می تواند منجر به نتایج نادرست آزمایش شود.

- **تجهیزات موردنیاز**

- فریزرهای ºC 20- و ºC 80- ، یخچال ºC 8-2
- دستگاه Real-time PCR دارای کانال های خوانش رنگ های سبز و زرد
- کیت یا سیستم اتوماتیک استخراج اسید نوکلئیک
- میکروتیوب های مخصوص واکنش Real-time PCR
- میکروتیوب های استریل (بدون DNase و RNase)
- ورک استیشن دارای لامپ UV / هود لامینار کلاس II
- میکرواسپین-ورتکس
- میکروسانتریفیوژ
- سمپلر و سرسمپلر مربوطه (0/5-10 میکرولیتر، 20-200 میکرولیتر و 100-1000 میکرولیتر)
- رک های خنک کننده فلزی ویژه آماده سازی واکش های Real-time PCR

- **حمل و نقل و شرایط نگهداری کیت**

این محصول باید در دمای 20 درجه زیر صفر حمل و نگهداری شود و در صورت نگهداری در دمای مذکور تا اتمام تاریخ انقضای درج شده بر روی جعبه ی آن قابلیت استفاده دارد. برای جلوگیری از کاهش حساسیت تست از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت (بیش از 3 بار) خودداری گردد.

- **محتویات کیت**

ردیف	اجزاء کیت برای 24 واکنش	مقدار
1	Master Mix	300µl
2	Calibrator 1 (10^4 IU/µl)	50µl
3	Calibrator 2 (10^3 IU/µl)	50µl
4	Calibrator 3 (10^2 IU/µl)	50µl
5	Calibrator 4 (10^1 IU/µl)	50µl
6	Internal Standard	50µl

- **دستگاه های Real-time PCR سازگار با محصول**

کانال های مورد نیاز جهت تحلیل نتایج تست : FAM/HEX

شماری از دستگاه هایی که قابلیت استفاده از کیت HBV Real time PCR سیناکلون (تهران کاوش کلون) در آن ها وجود دارد، شامل موارد زیر می شوند:

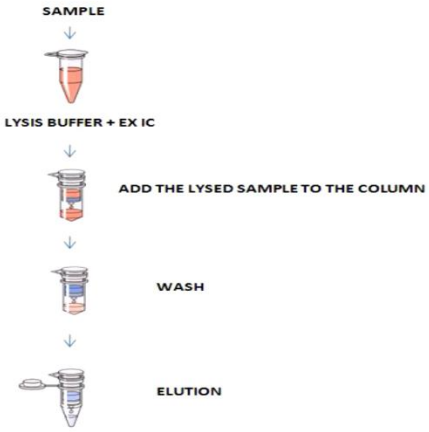
Applied Biosystems® - Step One/ Step One Plus
Applied Biosystems® - 7500 Fast/7900HT
Qiagen Rotor-Gene® - Q/ 3000/ 6000
LightCycler® - 96/480
QuantStudio™ - 5/6
Cobas® - 4800/ z480
Bio-Rad® - CFX iQ5/96
Tianlong Real-time PCR

- **استخراج اسیدنوکلئیک**

عملکرد سنجش به روش Real –Time PCR بستگی به میزان و کیفیت نمونه DNA دارد. استخراج DNA از نمونه ی سرم یا پلاسما باید توسط کیت های معتبر موجود در بازار و طبق پروتکل ویژه ی کیت مورد استفاده، انجام شود.

برای فرآیند استخراج کیت (SinaClon- EX6061) Viral DNA Extraction Kit توصیه می شود.

لازم به ذکر است که در ابتدای پروسه استخراج 2 میکرولیتر از ویال کنترل داخلی موجود در کیت تشخیص HBV به میکس نمونه و بافر لایز اضافه گردد و ادامه مراحل براساس دستورالعمل کیت استخراج انجام گردد.



شکل 1: مراحل استخراج DNA از نمونه

- **پروتکل آزمون تشخیصی Real-Time PCR**

ویال های حاوی اجزای واکنش را روی یخ خرد شده قرار دهید تا ذوب شوند (از ذوب و انجماد مکرر اجزای کیت خودداری نمایید). جهت رسوب قطرات در هر ویال آن ها را با دور پایین اسپین کنید .

لازم به ذکر است در حین آماده سازی مخلوط واکنش اجزای کیت باید در دمای 2-8 درجه ی سانتی گراد نگهداری شوند. علاوه بر نمونه ها، 5 ویال برای استاندارد ها و کنترل منفی آماده کنید.

1) 12 میکرولیتر از مسترمیکس را به هر میکروتیوب PCR اضافه کنید.
2) 8 میکرولیتر از نوکلئیک اسید استخراج شده را به هر میکروتیوب نمونه اضافه کنید.
3) 8 میکرولیتر از کنترل مثبت (استاندارد) را به هر میکروتیوب استاندارد اضافه کنید.
4) 8 میکرولیتر از آب Nuclease-Free را به میکروتیوب واکنش بدون نمونه الگو (NTC) اضافه نمایید.
5) درب میکروتیوب ها را بسته و آن ها را در دور پایین اسپین کنید.
6) میکروتیوب ها را در دستگاه Real-time PCR قرار داده و کانال مرتبط به خوانش رنگ های فلورسانس را تعیین کنید.

اجزاء	حجم (میکرولیتر)
Master Mix	12
Calibrator or DNA extraction sample	8

واکنش (NTC; Non Template Control)

با توجه به جدول زیر یک میکروتیوب برای واکنش بدون نمونه الگو (NTC) آماده کنید.

8 میکرولیتر از آب Nuclease-free را به میکروتیوب واکنش NTC اضافه کنید.

اجزاء	حجم (میکرولیتر)
Master Mix	12
Nuclease-free	8

انجام آزمایش Real-time PCR

میکروتیوب های آماده شده را در دستگاه Real-time PCR قرار دهید.

کانال مربوط به خوانش رنگ های فلورسانس را تعیین کنید.

NO	Name of channel	Source Wavelength (nm)	Detection Wavelength (nm)	Gene/s
1	FAM	495	520	HBV A-H
2	HEX	535	556	IC

آزمون را مطابق برنامه دمایی ذکر شده در جدول زیر اجرا کنید تا فرآیند تکثیر انجام شود.

- **برنامه ی دستگاه Real-time PCR**

Holding Stage	95 ° C	3 min	1 cycle
PCR cycles	95 ° C	15 s	45 cycles
	58 ° C	40 s	

دمای 58 ° C برای خوانش رنگ های فلورسانس انتخاب گردد.

آنالیز نتایج

1- کنترل مثبت

در مرحله اول، عملکرد استانداردها را بررسی کنید. Ct منحنی استانداردهای متوالی باید با سه سیکل تفاوت مشاهده شوند. (اختلاف ±1 سیکل مورد تایید است).

2- واکنش NTC

در شرایط ایده آل، نتیجه واکنش NTC، باید به صورت یک خط مسطح (نتیجه منفی) باشد که نشان دهنده عدم آلودگی مواد زمینه واکنش می باشد. همچنین در صورت مشاهده منحنی تکثیر NTC در Ct>38 معتبر بوده و نتیجه آزمون از این نظر مورد تایید است و نیازی به تکرار آزمون نیست.

- در صورت مشاهده منحنی تکثیر در Ct<38، نتایج نامعتبر بوده و بایستی آزمون مجددا تکرار شود.

3- کنترل داخلی IC

منحنی تکثیر بدست آمده برای ژن کنترل داخلی IC، نشان دهنده استخراج موفقیت آمیز DNA و نیز عملکرد مطلوب و کیفیت مواد بیولوژیکی واکنش می باشد.

-اگر نمونه تست دارای منحنی تکثیر برای ژن IC با مقدار Ct<38 باشد، استخراج DNA و انجام واکنش مورد تایید است.

بررسی نمونه مورد آزمون

-نمونه هایی که HBV مثبت هستند، بایستی دارای منحنی "سیگموئیدی" باشند.

-اگر فلورسانس منحنی از خط Threshold عبور کند و عدد Ct را نشان دهد، منحنی تکثیر قابل قبول است.

-نمونه تست دارای منحنی تکثیر با مقدار Ct<38 موید آن است که نمونه برای HBV مثبت است.
-اگر نمونه مورد آزمون دارای منحنی تکثیر با مقدار Ct>38 باشند، بایستی آزمون تکرار شود.

- **تحلیل نتایج**

تفسیر	نتیجه	سیگنال در کانال HEX	سیگنال در کانال FAM
مثبت	معتبر	Ct<38	Ct<38
مثبت	معتبر	-	Ct<38
منفی	معتبر	Ct<38	-
تکرار تست	نامعتبر	Ct>38	-
تکرار تست	نامعتبر	-	-

- **حساسیت تست**

حداقل تعداد کپی قابل تشخیص در این تست 25 IU/ml می باشد.

- **اختصاصیت تست**

کیت تشخیصی HBV qPCR Detection Kit شرکت سیناکلون (تهران کاوش کلون) برای توالی ژن هدف HBV طراحی شده است. بنابراین به صورت اختصاصی فقط توالی هدف در نمونه مورد آزمون را شناسایی می کند. کیت طراحی شده در بررسی In Silico هیچ گونه واکنش متقاطعی با سایر پاتوژن های زیر ندارد:

- Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
- Herpes simplex virus 2 (HSV-2)
- Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)
- Human T-lymphotropic virus I (HTLV-I)
- Human T-lymphotropic virus II (HTLV-II)
- Parvovirus B19
- Cytomegalovirus (CMV)
- Epstein-Barr virus (EBV)
- Hepatitis A virus (HAV)
- Hepatitis C virus (HCV)
- Hepatitis D virus (HDV)
- Hepatitis E virus (HEV)

- **ویژگی های فنی محصول**

توالی قطعه ی تکثیر شونده	توالی حفاظت شده DNA
اختصاصیت	ژنوتیپ های HBV (A-H)
حساسیت (LoD)	25 IU/ml
بازه ی خطی[1]	10^2-10^9 IU/ml
Dynamic range	25-10^9 IU/ml
Reporting units	IU/µl
نوع نمونه ی معتبر	سرم و پلاسما
ارزیابی کیفی خارجی	تست شده با QCMD Regularly

[1] Linear range

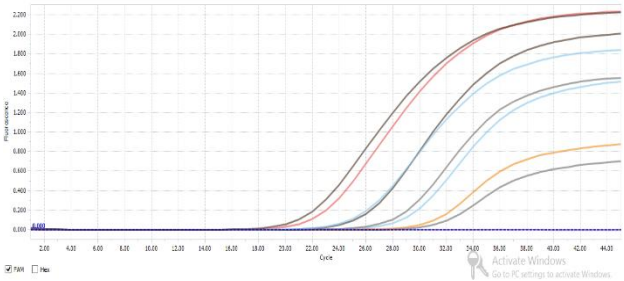
سیستم مدیریت کیفیت محصول بر اساس ملزومات ISO 13485 تدوین شده است.

- محاسبه ی کمی تیتر ویروس

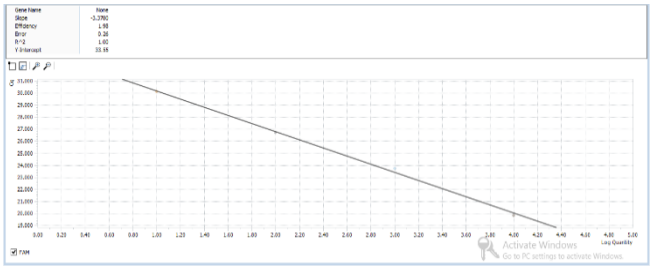
با استفاده از ویال های حاوی استاندارد در کیت، منحنی استاندارد رسم شده و تیتر ویروس مشخص می شود.
برای محاسبه ی غلظت ویروس با واحد (IU/mL) از فرمول زیر استفاده کنید.

$$\text{Sample concentration}\left(\frac{\text{IU}}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{Sample concentration (IU/µl)} \times \text{Elution volume (µl)}}{\text{Sample volume (ml)}}$$

- **معتبرسازی آزمون**

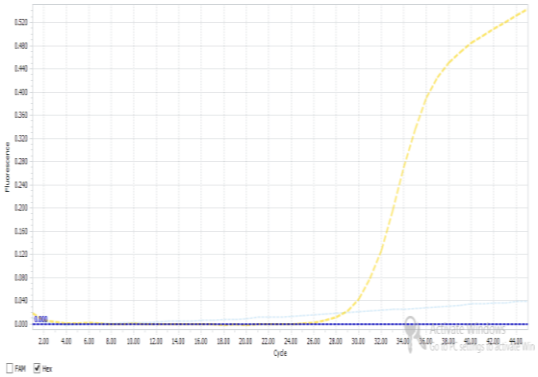


شکل 2: تشخیص استانداردهای کمی HBV SinaClon: Real Time PCR
در خوانش کانال FAM , QS1, QS2, QS3, QS4

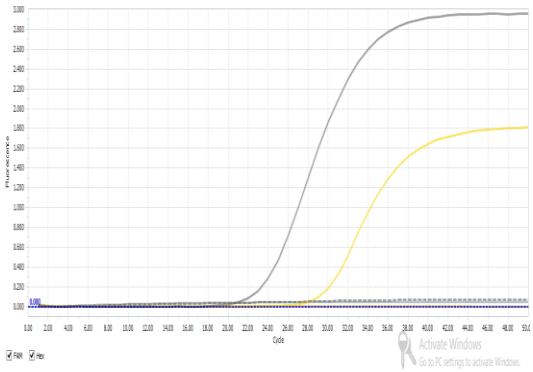


شکل 3:

ضریب همبستگی واکنش (R^2) : 1.00
شیب خط : 3/38-
بازده تست: 1/98



شکل 4: نتایج خوانش کانال HEX برای کنترل داخلی



شکل 5: نتایج خوانش کانال FAM برای نمونه مثبتHBV

	رنگ	نمونه	ضریب CT
1		کنترل مثبت	21/82
2		نمونه بیمار	28/63
3		کنترل داخلی	30/30
4		NTC واکنش	-

- **نشانه ها**

تعاریف	نشانه ها
آلودگی از طریق تماس با شخص یا وسیله	⚠
محدوده دمایی بر استفاده از محصول	
اطلاعات تشخیص پایان عمر مفید محصول	
فقط برای مصرف آزمایشگاه تشخیصی	IVD
دستورالعمل استفاده ازمحصول	
تعداد تست قابل استفاده	Σ
نشانگر سری ساخت محصول	LOT
نام و آدرس کارخانه سازنده محصول	
تاریخ تولید	
نشانگر کد فنی محصول	REF

- مراجع

[1] Abe A, Inoue K, Tanaka T, Kato J, Kajiyama N, Kawaguchi R, et al. Quantitation of Hepatitis B virus genomic DNA by Real Time detection PCR. J Clin Microbiol. 1999;37:2899-903

[2] Allice T,Cerutti F, Pittaluga F, Varetto S. Gabella S, Marzano A, et al. COBAS AmpliPrep-COBAS AaqMan hepatitis B virus (HBV) test: anovel automated Real Time PCR assay for Quantitation of HBV DNA in plasma. J Clin Microbiol. 2007;45:828-34

[3] Pas SD, Niesters HGM. Detection of HBV DNA using Real Time analysis. J Clin Virol. 2002;25;93-4.

[4] hillips AN, Pillay D, Miners AH, Bennett DE, Gilks CF, Lundgren JD. Outcomes from monitoring of patients on antiretroviral therapy in resource-limited settings with viral load, CD4 cell count, or clinical observation alone: a computer simulation model. Lancet. 2008;371:1443-51.

[5] Ribeiro NR, Campos GS, Angelo AL, Braga EL, Santana N, Gomes MM, et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection. Liver Int.2006;26:636-42.

[6] Roth WK, Weber M , Seifried E. Feasibility and efficacy of roution PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood- bank setting. Lancet. 1999;353:359-63.

[7] Sitnik R, Pinho JR, Bertolini DA, Bernardini AP, da silva LC, Carrilho FJ hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. . J Clin Microbiol. 2004;42:2455-60.

[8] Sitnik R, Sette H Jr, Santana RA, Menezes LC, Graca CH, Dastoli GT, et al. hepatitis B virus genotypes E detected in Brazil in an African patient who is a frequent traveler. Braz J Med Biol Res. 2007;40:1689-92.

[9] Stamer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. N Engl J Med. 2004;351:760-8.

[10] Thibault V, Pichoud C, Mullen C, Rhoads J, Smith JB, Bitbol A, et al. Characterization of a new sensitive PCR assay for quantification of viral DNA isolated from patients with hepatitis B virus infections. . J Clin Microbiol. 2007;45:3948-53.

[11] Weiss J, Wu H, Farrenkopf B, Schultz T, Song G, Shah S, et al. Real Time TaqMan PCR detection and quantitation of HBV genotypes A-G with the use of an internal quantitation standard. J Clin Virol. 2004;30:86-93.

[12] Araujo NM, Mello FC, Niel C, Gomes SA. High proportion of subgroup À (genotype A) among Brazilian isolates of hepatitis B virus. Arch Virol. 2004;149:1383-95.

[13]https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/reverse-transcribing-dna-andrnaviruses2011/w/rt_viruses/155/hepadnaviridae

[14] https://academic.oup.com/labmed/article/42/8/488/2657686

[15] https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b

[16] Versalovic, James, Carroll, Karen C.,Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

[17] Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.