کیت rRT-PCR ویروس دانگی
Dengue Virus rRT-PCR Kit

Ref: APDENVRK1 (Research Use Only, RUO)

فهرست مطالب

۱) مقدمه ۲

۲) اصول انجام آزمایش ۲

۳) محتویات کیت ۲

۴) مواد و وسایل مورد نیاز ۳

۵) شرایط نگهداری کیت ۳

۶) ایمنی زیستی ۳

۷) جمع‌آوری نمونه ۴

۸) روش انجام آزمایش ۴

۹) آنالیز داده‌ها و گزارش آن‌ها ۵

۱۰) محدودیت‌ها ۷

۱۱) ویژگی‌های عملکرد ۷

۱۲) کنترل کیفیت ۸

۱۳) تداخل ۸

۱۴) دفع پسماندها ۸

۱۵) منابع ۸

۱۶) علائم و توضیحات ۹

شرکت دانش بنیان پژوهش و توسعه امیرپیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، طبقه ۳، واحد ۱

کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۹

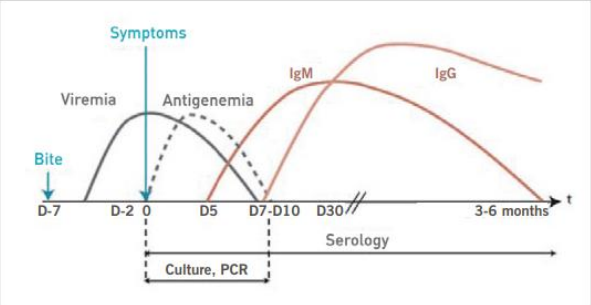
021-22920776

co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com

۱) مقدمه:

تب دنگی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی منتقله از بندپایان است که حدود نیمی از جمعیت جهان در حال حاضر در معرض خطر ابتلا به این ویروس می‌باشند و تخمین زده می‌شود که سالانه ۱۰۰ تا ۴۰۰ میلیون نفر به این عفونت مبتلا می‌شوند. این بیماری در اثر عفونت با یکی از چهار سروتیپ ویروس دنگی (DENV-1, -2,-3 and -4) ایجاد می‌شود که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری (بیش‌تر در مناطق شهری و نیمه‌شهری) جهان در گردش است. ویروس دنگی به عنوان عضوی از خانواده Flaviviridae، دارای RNA تک‌رشته‌ای می‌باشد و عمدتاً از طریق نیش پشه‌های آلوده Aedes aegypti یا Aedes albopictus به افراد منتقل می‌شود. مادران باردار آلوده می‌توانند ویروس را در دوران بارداری یا در زمان تولد، به جنین خود منتقل کنند. در موارد نادر، تب دنگی می‌تواند از طریق انتقال خون، جراحات ناشی از سوزن و پیوند اعضا منتقل شود. اگرچه عفونت با یک سروتیپ باعث مصونیت مادام‌العمر در برابر آن سروتیپ می‌شود، اما لزوماً در برابر عفونت ثانویه با سروتیپ دیگر محافظت ایجاد نمی‌کند. در واقع، ممکن است آنتی‌بادی‌های موجود، با ایجاد واکنش متقاطع سبب افزایش شدت بیماری گردند. اکثر افراد مبتلا به تب دنگی فاقد علامت مشخص می‌باشند. با این حال در صورت بروز، شایع‌ترین علائم شامل تب، سردرد، درد عضلانی، لرز، درد پشت چشم، حالت تهوع، استفراغ و بثورات پوستی می‌باشد که بیش‌تر آن‌ها پس از گذشت ۱ تا ۲ هفته بهبود می‌یابد. برخی از علائم هشدار دهنده بیماری (که نیاز به مراقبت فوری پزشکی دارند) شامل درد شکم، خونریزی از بینی یا لثه، بی‌قراری و خستگی می‌باشد. در برخی از موارد، تب دنگی می‌تواند به بیماری شدید همراه با شوک، خونریزی گسترده، درگیری اندام‌های حیاتی (قلب، کبد، مغز) و در نهایت به مرگ منجر شود. با این حال این بیماری معمولاً قابل بهبود بوده و میانگین مرگ و میر ناشی از آن کمتر از ۱٪ می‌باشد، که در صورت عدم درمان در حالت شدید بیماری این عدد تا ۱۵٪ افزایش می‌یابد. تشخیص زودهنگام تب دنگی، از طریق شناسایی ژنوم ویروس در طول مرحله‌ی حاد بیماری (از شروع علائم تا ۷-۵ روز بعد) توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونویسی معکوس (RT-PCR) منجر به درمان موثر می‌گردد. کیتDengue Virus rRT-PCR Kit شرکت پژوهش و توسعه‌ی امیرپیوند توانایی تشخیص هر چهار سروتیپ ویروس دنگی را به صورت همزمان با استفاده از تکنیک Real-Time PCR تک‌مرحله‌ای با هدف بهبود سلامت عمومی و سرعت بخشیدن به شناسایی و درمان تب دنگی دارد.



شکل ۱) توالی بروز مارکرهای بالینی برای تشخیص ویروس دنگی

۲) اصول انجام آزمایش:

سنجش اسیدهای نوکلئیک با استفاده از تکنیک Real-Time PCR یکی از حساس‌ترین، خاص‌ترین و سریع‌ترین روش‌های تشخیص ویروس‌ها است. RNA ویروسی از نمونه‌ها استخراج شده و پس از تبدیل شدن به cDNA در همان میکروتیوب، مناطق خاصی از cDNA تکثیر می‌شود. بعلاوه، در آزمایش Real-Time PCR از پروب‌های فلوروژنیک مبتنی بر TaqMan استفاده می‌شود. این پروب‌ها با استفاده از فعالیت ′۵ نوکلئازی Taq DNA polymerase در چرخه‌های PCR امکان شناسایی محصولات اختصاصی را فراهم می‌آورد. کیت PCR شرکت AP-RAD برای تشخیص وجود Dengue Virus در نمونه‌های سرم انسانی مشکوک به عفونت‌های ویروسی، به طور همزمان از پرایمرها و پروب‌های اختصاصی برای سنجش ژن هدف *NS1* (Dengue Viurs) همراه با کنترل داخلی (*RNase P*) در یک میکروتیوب استفاده می‌کند.

۳) محتویات کیت:

در این کیت حجم نهایی هر واکنش ۲۰ µL می‌باشد.

شماره	محتویات کیت ۲۵ تستی	مقدار
۱	مسترمیکس آماده برای استفاده در RT-PCR تک مرحله‌ای	۳۷۵ µL
۲	کنترل مثبت	۵۰ µL
۳	کنترل منفی	۵۰ µL

شرکت دانش بنیان پژوهش و توسعه امیرپیوند
ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، طبقه ۳، واحد ۱
کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۹
021-22920776
co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com

شماره	محتویات کیت ۵۰ تستی	مقدار
۱	مسترمیکس آماده برای استفاده در RT-PCR تک مرحله‌ای	۷۵۰ µL
۲	کنترل مثبت	۱۰۰ µL
۳	کنترل منفی	۱۰۰ µL

۴) مواد و وسایل مورد نیاز:

- هر نوع دستگاه ارزیابی و کالیبر شده Real-Time PCR با کانال سبز (FAM) و زرد (HEX، VIC یا JOE)
- هود ایمنی زیستی کلاس II و PCR workstation
- سمپلرهای متغیر در حجم‌های 0.5-10 µL، 10-100 µL و 100-1000 µL
- تجهیزاتی نظیر ورتکس و Minispin
- کیت استخراج RNA ویروسی
- ظروف پلاستیکی: میکروتیوب با حجم ۰/۱ یا ۰/۲ میلی‌لیتر عاری از DNase/RNase یا پلیت‌های مخصوص دستگاه ریل تایم
- مواد مصرفی: دستکش یکبار مصرف فاقد پودر، روپوش آزمایشگاهی، سرسمپلرهای دارای فیلتر آئروسل در حجم‌های 10 µL، 100 µL و 1000 µL، خودکار علامت‌گذاری آزمایشگاهی و رول دستمال کاغذی
- فریزر (≤ -۲۰ °C)

۵) شرایط نگهداری کیت:

- دمای استاندارد برای نگهداری محتویات این کیت (≤ -۲۰ °C) می‌باشد. حفظ دما در مدت زمان نگهداری محصول الزامی است.
- مدت زمان مناسب برای استفاده از کیت و تاریخ انقضا نیز بر روی کیت درج شده است.

توجه:

- نگهداری کیت به مدت طولانی در دمای اتاق منجر به بروز نتایج نادرست می‌گردد. نگهداری کیت در تاریکی الزامی است.
- پایداری کیت در مقابل عمل freeze thaw (ذوب و انجماد) تا دو مرتبه کنترل شده و توصیه می‌شود تنها دو مرتبه این عمل بر روی کیت اعمال شود. پیشنهاد می‌گردد جهت جلوگیری از تکرار ذوب و منجمد کردن کیت، در اولین زمان ذوب کردن، محتویات کیت را به میزان مورد نظر در هر run دستگاه در میکروتیوب‌های مخصوص تقسیم (Aliquot) کرده و مجددا منجمد نمائید.

۶) ایمنی زیستی:

آزمایشگاه می‌بایست یک ارزیابی خطر (risk assessment) را برای تأسیسات خود و رویه‌هایی که برای بررسی بیماران مشکوک به عفونت‌های ویروسی صورت می‌پذیرد، انجام دهد. پس از انجام این ارزیابی خطر، می‌توان هنگام کار با نمونه‌های بیماران مشکوک به بیماری‌های ذکر شده، شیوه‌های ایمنی زیستی مضاعف، مانند PPE تقویت شده را انتخاب کرد. بدیهی است که استفاده از شیوه‌های مختلف ایمنی از جمله استفاده از وسایل حفاظت شخصی از قبیل دستکش، ماسک، روپوش و غیره حین کار الزامی می‌باشد. تمامی نمونه‌ها را آلوده و عفونی تلقی کنید.

۶-۱) موارد احتیاطی و پیشگیری:

۱. پیش از شروع آزمایش، دستورالعمل کیت را به دقت مطالعه نمایید.
۲. پیش از انجام آزمایش از تمیز و ضدعفونی (Decontamination) بودن محل انجام تست اطمینان حاصل کنید.
۳. توصیه می‌شود حمل و نقل کیت در دمای کم‌تر از -۲۰ °C صورت پذیرد.
۴. از استفاده از کیت‌های دارای نقص اجتناب نمایید.
۵. محلول‌های استفاده نشده را مطابق با قوانین و مقررات کشوری امحا نمایید.
۶. کیفیت نمونه RNA از اهمیت بالایی برخوردار است و می‌تواند نتایج آزمایش را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین استفاده از روش‌ها و کیت‌های استاندارد و صحه‌گذاری شده برای استخراج ژنوم ویروس الزامی است و استفاده از کیت‌های غیر منجر به نتایج منفی کاذب می‌گردد. هم چنین، به منظور به حداقل رساندن تخریب RNA توسط ریبونوکلئاز، توصیه می‌شود بلافاصله پس از جمع‌آوری نمونه، استخراج RNA آغاز گردد. هنگام کار با RNA، به منظور پیشگیری از آلودگی نمونه توسط ریبونوکلئاز روی پوست دست، همیشه از دستکش استفاده کنید.
۷. با توجه به حساسیت بالای تکنیک Real-Time PCR، لازم است جهت جلوگیری از بروز نتایج مثبت کاذب از عدم آلودگی محیط کار و ابزارها با RNA، cDNA یا محصولات PCR سایر نمونه‌ها، اطمینان حاصل نمایید. پرسنل آزمایشگاه باید ملزومات پوشش حرفه‌ای را که شامل دستکش‌های یکبار

مصرف، عینک و گان یا روپوش آزمایشگاه تمیز است را رعایت کنند. مراحل انجام کار باید به گونه‌ای سازماندهی شوند که گردش یک سویه کار حفظ شده و هیچ‌گاه محصولات واکنش در خلاف جهت این مسیر انتقال پیدا نکنند.

۸. تمام مراحل استخراج و آماده‌سازی معرف‌ها برای انجام آزمایش باید در فضای هود بیولوژیک کلاس II و PCR workstation انجام شود.

۹. میزهای آزمایشگاهی، سمپلرها و روپوش‌های آزمایشگاهی باید به طور منظم تمیز و آلودگی زدایی شوند.

۱۰. توصیه می‌شود در تمام مراحل انجام آزمایش از سرسمپلرهای دارای فیلتر آئروسل استفاده شود. پس از انجام PCR، باید میکروتیوب‌ها با احتیاط امحا شوند تا از ریختن محصولات تکثیر یافته جلوگیری شود.

۱۱. آزمایشگاه‌ها می‌بایست طبق پروتکل، گزارشات نتایج مثبت بحرانی خود را به مراجع تعیین شده توسط وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی گزارش دهند.

۱۲. کیت را هنگام نگهداری و حین حمل و نقل به حالت ایستاده قرار دهید.

۱۳. پیش از استفاده از کیت، ویال‌ها را از لحاظ بروز نشتی یا آسیب بررسی کنید.

۱۴. هر یک از محتویات کیت باید در دمای اتاق ذوب شوند، کاملاً مخلوط شده و پیش از استفاده به مدت کوتاهی با دور پایین سانتریفیوژ یا اسپین شوند.

۱۵. سرسمپلرها می‌بایست پس از استفاده در یک Safety box ریخته شوند. سطوح محل کار و ابزار باید با محلول سدیم هیپوکلریت ۱۰٪ تازه تهیه شده ضدعفونی شوند سپس با اتانول ۷۰٪ یا آب مقطر تمیز شوند و در نهایت لامپ UV به مدت ۳۰ دقیقه به منظور ضدعفونی سطوح کار، روشن شود.

۱۶. تمام مراحل استخراج و آماده‌سازی معرف‌ها برای انجام آزمایش باید در فضای هودبیولوژیک کلاس II و PCR workstation انجام شود.

۱۷. وسایلی که برای انجام آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفته‌اند، باید بر اساس دستورالعمل ذکر شده در دفترچه راهنمای دستگاه، به صورت منظم کالیبره شوند تا امکان بروز cross-contamination میان کانال‌ها از بین برود.

۷) جمع‌آوری نمونه:

نمونه‌ها از سرم تهیه می‌شود.

نکته:

- برای انجام تست بر روی نمونه سرم، نمونه‌گیری باید در لوله‌های لخته ژل‌دار خلاء انجام شود. مایع رویی پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه (۳۵۰۰rpm) شامل سرم می‌باشد.
- سرم بیمار باید تا حداکثر ۶ ساعت پس از نمونه‌گیری جمع‌آوری شود.
- نمونه‌ی سرم بیمار باید طی ۵ تا ۷ روز اول ابتلا به بیماری (فاز حاد بیماری) جمع‌آوری شود.

۷-۱) نگهداری و دمای مناسب برای انتقال نمونه:

- نمونه‌ها را می‌توان تا ۲۴ ساعت پس از جمع‌آوری در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. اگر احتمال تاخیر در انجام آزمایش یا ارسال وجود دارد، نمونه‌ها را در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد یا کمتر نگهداری کنید.
- نمونه‌ها می‌بایست مطابق با دستورالعمل فعلی تنظیم مقررات انجمن بین‌المللی حمل و نقل هوایی (IATA) تحت عنوان کالای خطرناک بسته‌بندی و منتقل شوند.

۷-۲) شرایط رد نمونه:

- جمع‌آوری نمونه در ظرف غیر استریل
- انواع نمونه‌های نامعتبر
- نمونه‌های با لیبل مخدوش و یا فاقد نام و مشخصات
- نمونه‌های دارای حجم ناکافی
- دریافت نمونه‌های فریز نشده پس از گذشت بیش از ۲۴ ساعت از زمان جمع‌آوری آن‌ها
- نمونه‌های همولیز

۸) روش انجام آزمایش:

ریبونکلئیک اسیدها با استفاده از کیت معتبر استخراج RNA ویروس از نمونه‌های جمع‌آوری شده استخراج می‌شوند. اسید نوکلئیک خالص شده مستقیما با استفاده از مسترمیکس موجود در کیت در هر دستگاه Real-Time PCR تایید شده تکثیر می‌گردد. در این فرآیند، پروب به سکانس هدف ویژه‌ای که میان پرایمرهای Forward و Reverse واقع شده‌اند، متصل می‌گردد. در طی فاز گسترش چرخه PCR، فعالیت ′۵ نوکلئازی Taq polymerase، پروب

را تخریب کرده و منجر به جدا شدن رنگ ریپورتر از رنگ quencher شده و سیگنال فلورسنت ایجاد می‌کند. در هر چرخه، مولکول‌های اضافی رنگ ریپورتر از پروب مربوطه جدا می‌شوند و شدت فلورسانس را افزایش می‌دهند. شدت فلورسانس در هر چرخه PCR توسط دستگاه Real-Time PCR ثبت می‌شود.

۸-۱) استخراج و تخلیص نوکلئیک اسید:

RNA را می‌توان به طور مستقیم از نمونه‌های سرم انسان، جمع‌آوری و سپس به وسیله کیت‌های معتبر استخراج RNA (Qiagen DSP Viral RNA، RNJia Virus Kit و High Pure Viral Nucleic Acid Roche) و یا روش‌های دستی و دستگاهی استخراج کرد. کیت Dengue Virus rRT-PCR Kit، با کیت‌های استخراج RNA نامبرده سازگار می‌باشد.

۸-۲) روش rRT-PCR کیفی یک مرحله‌ای بر پایه TaqMan:

rRT-PCR کیفی تک مرحله‌ای به روش زیر انجام می‌شود.

۱. به ترتیب میکروتیوب‌های آماده استفاده را به صورت دوتایی برای هر بیمار و به صورت تکی برای کنترل مثبت، منفی و بدون الگو (NTC) مرتب و نام‌گذاری کنید.

توجه: برای دستیابی به نتایج قابل اعتماد و دقیق، بر انجام PCR به صورت دوتایی (duplicate) برای هر بیمار تأکید می‌شود.

۲. تمام میکروتیوب‌ها را بر روی رک سرد قرار دهید.

۳. ۱۵ µL از مسترمیکس آماده را به تمامی میکروتیوب‌های مشخص شده اضافه کنید.

۴. ۵ µL از آب مقطر استریل را به میکروتیوب No Template Control (NTC) اضافه کنید و سپس درب میکروتیوب را ببندید.

۵. ۵ µL از کنترل منفی را به میکروتیوبی که برای کنترل منفی مشخص شده است اضافه کنید و سپس درب میکروتیوب را ببندید.

۶. ۵ µL از RNA بیمار را به هر یک از دو میکروتیوبی که برای هر بیمار مشخص شده است، اضافه کنید و سپس درب میکروتیوب را ببندید.

۷. ۵ µL از کنترل مثبت به میکروتیوبی که برای کنترل مثبت مشخص شده است، اضافه کنید و سپس درب میکروتیوب را ببندید.

۸. میکروتیوب‌ها را برای مدت زمان کوتاهی اسپین کنید.

۹. سپس میکروتیوب‌ها را در دستگاه Real-Time PCR قرار دهید و برنامه را همانگونه که در برنامه واکنش حرارتی ذکر شده است، اجرا کنید.

نکته: توجه به ترتیب اضافه نمودن نمونه‌ها، مطابق مراحل فوق به منظور جلوگیری از آلودگی به طور جدی توصیه می‌گردد.

خلاصه‌ای از مراحل انجام تست برای یک واکنش

حجم مسترمیکس آماده	حجم نمونه
۱۵ µL	۵ µL

۸-۳) مشخصات واکنش حرارتی:

مرحله	دما	زمان	چرخه
رونویسی معکوس (RT)	۵۰ °C	۳۰ دقیقه	۱
فعال‌سازی اولیه	۹۵ °C	۱ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۵ °C	۱۵ ثانیه	۴۵
انیلینگ/گسترش	۶۰ °C	۳۵* ثانیه	

* FAM برای Dengue Virus و HEX، VIC یا JOE برای *RNase P* (کنترل داخلی) تنظیم شود.

کانال سبز (FAM)	کانال زرد (HEX، VIC یا JOE)
Dengue Virus	*RNase P*

۹) آنالیز داده‌ها و گزارش آن‌ها:

نتایج با استفاده از نرم افزار دستگاه‌های Real-Time PCR با مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت که از خط Threshold (آستانه) عبور می‌کند، در دستگاه Rotor-Gene کیاژن، برای ژن‌های اصلی و کنترل داخلی ۰/۰۵ می‌باشد و یا مطابق دستورالعمل‌های دستگاه تفسیر می‌شود و در دستگاه‌های دیگر مطابق دستورالعمل‌های دستگاه تفسیر می‌شود. فرآیند انتخاب آستانه باید با روندی ثابت برای تمامی نمونه‌ها انجام شود. تنظیم دقیق خط آستانه می‌تواند برای دستگاه‌های مختلف، متفاوت باشد و نیاز است که براساس نمودار امپلیفیکیشن تعریف شود. اگر از تنظیم خودکار خط آستانه استفاده می‌کنید، حتما درستی آن را بررسی نمایید. به طور معمول، خط آستانه باید منحنی‌های امپلیفیکیشن فلورسنت به شکل S (سیگموئیدی) را برای کنترل و نمونه‌های مثبت قطع

کند و نباید بر روی خط پایه قرار گیرد. در غیر این صورت خط آستانه را به صورت دستی (manually) بالای خط فلورسنت پایه و در فاز خطی تقویت نمایی (exponential amplification) تنظیم کنید.

۹-۱) تفسیر:

آنالیز نتایج با استفاده از میزان Cycle of threshold (Ct) اندازه‌گیری شده برای هر ژن هدف تعیین می‌شود. در صورتی که منحنی امپلیفیکیشن سیگموئیدی باشد و میزان Ct برای هر هدف طی ۴۵ سیکل کمتر یا مساوی ۴۰ (Ct value ≤ 40) باشد، مثبت خوانده می‌شود. هنگامی که منحنی امپلیفیکیشن به شکل سیگموئیدی نباشد و میزان Ct بیشتر از ۴۰ باشد (Ct value > 40)، منفی خوانده می‌شود.

- کیت Dengue Virus rRT-PCR Kit تشخیصی AP-RAD دارای کنترل‌های مثبت و منفی برای Dengue Virus و همچنین کنترل داخلی می‌باشد.
- میزان Ct می‌بایست برای کنترل مثبت، مساوی یا کمتر از ۳۵ (35 ≤) و برای کنترل منفی کاملا مسطح یا Flat و بدون افزایش سیگموئیدی باشد. میزان Ct برای کنترل داخلی (*RNase P*) در کنترل مثبت و منفی، می‌بایست مساوی یا کمتر از ۳۵ (35 ≤) باشد.
- تمامی کنترل‌های آزمایش باید پیش از تفسیر نتایج بیمار، بررسی شوند (جدول شماره ۱).
- اگر کنترل‌ها مورد تائید نیستند، نباید نتایج آزمایش بیماران تفسیر گردد. در صورتی که کنترل‌ها عملکرد مورد انتظار را آن گونه که شرح داده شد نشان نمی‌دهند، ممکن است نحوه انجام آزمایش نادرست باشد، یا خرابی در معرف و یا نقص در تجهیزات رخ داده باشد. در این صورت، آزمایش را تایید نکرده و مجددا تکرار نمایید.

(جدول شماره ۱)

نام کنترل خارجی	برای نظارت بر	Dengue Virus FAM	*RNase P* HEX، VIC یا JOE	میزان مورد انتظار
کنترل مثبت	عملکرد اجزای معرف نظیر پرایمر و پروب‌ها	+	+	Ct ≤ 35
کنترل منفی	آلودگی معرف و یا محیط	-	+	Ct > 40 به جز کنترل داخلی
فاقد الگو (NTC)	آلودگی معرف و یا محیط	-	-	Ct > 40

۹-۲) تفسیر نتایج بیمار:

تفسیر نتایج بیمار با توجه به Ct هر یک از نمونه‌ها مشخص می‌گردد و اگر میزان آن کمتر یا بیشتر از ۴۰ باشد، تشخیص داده می‌شود. خلاصه‌ای از تفسیر نتایج در جدول شماره ۲ وجود دارد.

(جدول شماره ۲)

اقدامات	Report	Result Interpretation	Dengue Virus FAM	*RNase P* HEX، VIC یا JOE
گزارش جواب	Dengue Virus مثبت	**Dengue Virus Detected**	+	±
نتیجه را گزارش کنید. آزمایش‌هایی را برای شناسایی سایر میکروارگانیسم‌ها در نظر بگیرید.	منفی	**Dengue Virus Non-Detected**	-	+
استخراج و آزمایش را تکرار کنید. اگر همچنان نامعتبر شد، مجددا از بیمار نمونه بگیرید.	نامعتبر	**Invalid result**	-	-

- در غیاب *RNase P* یا کنترل داخلی، اگر افزایش فلورسنت در هر یک از میکروتیوب‌ها (به جز میکروتیوب NTC) اتفاق بیفتد، نتایج نباید گزارش شوند.
- در نمونه‌هایی که نتیجه منفی می‌شود Ct برای کنترل داخلی (*RNase P*) می‌بایست مساوی یا کمتر از ۳۵ باشد. در حالیکه احتمال Ct > ۳۵ در کنترل داخلی برای نمونه‌هایی که پاسخ مثبت با میزان بالا در ژن اصلی بروز می‌کند وجود دارد (±).
- در صورت افزایش فلورسنت در میکروتیوب NTC، می‌بایست آزمایش تکرار شود و احتمال آلودگی وجود دارد.
- در صورت افزایش فلورسنت در میکروتیوب کنترل منفی (به جز کنترل داخلی)، می‌بایست آزمایش تکرار شود و احتمال بروز آلودگی وجود دارد.
- در صورت منفی شدن نتیجه ژن، پیشنهاد بررسی ژن سایر ارگانیسم‌های مولد عفونت داده می‌شود.

نکته مهم:

- از نتایج این کیت نباید به تنهایی جهت تشخیص (تائید یا رد حضور ویروس) استفاده نمود و می‌بایست در تفسیر نتایج و اتخاذ تصمیم به کلیه‌ی یافته‌های بالینی، داده‌های آزمایشگاهی و اپیدمیولوژی توجه شود.

- به علت احتمال حضور عفونت همزمان، تفسیر نتایج باید با توجه به تمام داده‌های بالینی و آزمایشگاهی انجام شود.

۱۰) محدودیت‌ها:

۱. این کیت برای تشخیص کیفی وجود Dengue Virus RNA در نمونه‌های سرم انسان استفاده می‌شود. نتایج نشان‌دهنده‌ی میزان ویروس در نمونه‌ها نمی‌باشد.

۲. تمام اطلاعات بالینی، آزمایشگاهی و اپیدمیولوژیک برای تفسیر باید در نظر گرفته شود، زیرا احتمال آلودگی وجود دارد.

۳. نمونه‌های مورد آزمایش باید مطابق با شرایط مشخص شده در دستورالعمل جمع‌آوری، پردازش، نگهداری و حمل شده باشند، زیرا ممکن است آماده‌سازی نمونه و انجام آزمایش به شیوه غلط منجر به دریافت نتایج نادرست شود.

۴. استخراج اسید نوکلئیک از نمونه‌های بالینی باید توسط کیت استخراج معتبر انجام شود. سایر روش‌های استخراج و سیستم‌های پردازش ارزیابی نشده‌اند.

۵. تقویت و شناسایی ویروس ذکر شده با کیت تشخیصی AP-RAD با دستگاه Real-Time PCR، Rotor-Gene Q 5plex (Qiagen) تصدیق شده است. استفاده از سایر دستگاه‌ها باید تائید شود.

۶. محدوده تشخیص (LOD) با اطمینان ۹۵٪ تعیین می‌شود. هنگامی که ویروس‌های مورد نظر با غلظتی مشابه با LOD در نمونه آزمایش وجود داشته باشند، احتمال پاسخ منفی کاذب کم است. هنگامی که ویروس در نمونه مورد آزمایش در غلظتی کمتر از LOD وجود داشته باشد، نیز احتمال یافتن آن‌ها وجود دارد.

۷. پرایمرها و پروب‌های این کیت، مناطق بسیار محافظت شده در ژنوم Dengue Virus را مورد هدف قرار می‌دهند، که احتمال تشخیص متقاطع را منتفی می‌کند. بروز جهش در این مناطق بسیار حفاظت شده (اگرچه بسیار نادر است) می‌تواند منجر به غیر قابل تشخیص شدن RNA ویروس شود.

۸. نتایج منفی، نشان دهنده عدم ابتلا به ویروس مورد نظر نیست و نباید تنها مبنای درمان یا سایر تصمیمات مدیریتی قرار گیرد.

۹. کارکنانی که مسئول بررسی و آنالیز هستند، می‌بایست پیش از انجام آزمایش با روند انجام آزمایش و تفسیر نتایج آشنایی داشته و آموزش دیده باشند.

۱۰. چنانچه تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه به علت جمع‌آوری، انتقال و استخراج نادرست به آن به مقدار کافی نباشد، ممکن است جواب آزمایش منفی کاذب شود.

۱۱. چنانچه مقدار خیلی زیادی از الگوی RNA در واکنش وجود داشته باشد، ممکن است جواب آزمایش، منفی کاذب شود.

۱۲. چنانچه نمونه بیمار پس از پایان ۷ روز از شروع علائم بیماری (فاز حاد) جمع‌آوری شود، احتمال کاهش سطح ویروس در نمونه و بروز پاسخ منفی کاذب افزایش می‌یابد.

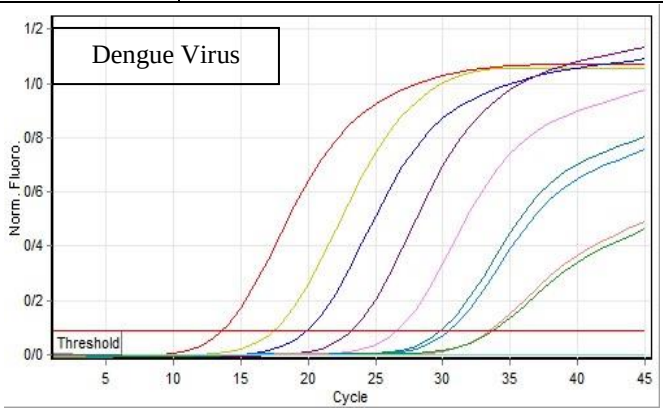
۱۱) ویژگی‌های عملکرد:

این کیت قادر به تشخیص همزمان ژنوم Dengue Virus به عنوان مارکر اختصاصی و ژن *RNase P* به عنوان کنترل داخلی می‌باشد.

۱-۱۱) حساسیت آنالیتیکال (محدوده تشخیص یا LOD):

آزمایش‌های حساسیت آنالیتیکال (محدوده تشخیص یا LOD) برای تشخیص و تعیین کمترین غلظت Dengue Virus انجام شده است که ۱۰۰٪ از تمام replicate ها مثبت (مثبت حقیقی) شد. محدوده تشخیص (LOD) محاسبه شده کیت برای اندازه‌گیری Dengue Virus، ۰/۸۳ copy/µL می‌باشد، که این امر، نشان دهنده حساسیت تشخیصی بالای کیت حتی در بیماران با اندک میزان ویروس نامبرده است، که این حالت به خصوص در بیمارانی که تحت درمان قرار دارند، غیر معمول نیست.

Dengue Virus rRT-PCR Kit	مثبت	منفی کاذب
حساسیت آنالتیکال	۲۰	۰
۱۰۰٪		



شکل ۲) گراف مربوط به حساسیت آنالیتیکال Dengue Virus

021-22920776
co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com
شرکت دانش بنیان پژوهش و توسعه امیرپیوند
ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، طبقه ۳، واحد ۱
کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۹

۲-۱۱) حد آستانه مثبت:

با توجه به مطالعه‌ی مقدار مرجع، Ct مرجع برای ژن هدف این کیت ≥ ۴۰ و برای کنترل داخلی ≥ ۳۵ می‌باشد.

۳-۱۱) اختصاصیت آنالیتیکال:

این کیت منحصراً قادر به شناسایی ژنوم Dengue Virus می‌باشد. پرایمرها و پروب‌ها به گونه‌ای طراحی شده‌اند که با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای دیگر هیچگونه واکنش متقاطعی نداشته باشند. به منظور تائید اختصاصیت کیت Dengue Virus rRT-PCR Kit شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند، اختصاصیت کیت به دو روش آنالیز آزمایشگاهی(WET) و آنالیز بیوانفورماتیک (In-Silico PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت.

* میکروارگانیسم‌های ارزیابی شده در روش آنالیز آزمایشگاهی(WET) و آنالیز بیوانفورماتیک (In-Silico PCR) شامل موارد زیر می‌باشند:

Respiratory syncytial virus, Parvovirus B19, Adenovirus, BK virus, Cytomegalovirus, SARS-CoV-2, Epstein–Barr virus, Influenza A virus, Influenza B virus, Varicella-zoster virus, Rotavirus, Influenza A virus subtype H1N1, Hepatitis B virus, Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2, Streptococcus pneumonia, Bordetella species, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae, Bordetella parapertussis, Hepatitis C virus, Human papillomavirus, Human T-lymphotropic virus 1, JC virus, Enterovirus, Mumps virus, Human herpesvirus 6, Human herpesvirus 8 and Human immunodeficiency virus

۴-۱۱) دقت (Precision):

تست سنجش میزان تکرارپذیری (repeatability) این کیت به وسیله ۲ رقت متفاوت پلاسمید و همینطور ۱ نمونه منفی تایید شده به صورت ۲ بار تکرار در یک run کاری طی ۱۰ روز توسط ۱ لات نامبر از کیت انجام شد. به علاوه، تست سنجش میزان تجدیدپذیری (reproducibility) این کیت به وسیله ۳ رقت متفاوت پلاسمید و همینطور۱ نمونه منفی تایید شده به صورت سه بار تکرار، طی ۵ روز کاری (روزی یک run) توسط ۲ دستگاه و ۲ لات نامبر از کیت انجام شد. در تمام موارد بررسی شده، نتایج با جواب مورد انتظار همخوانی داشت و محاسبه درصد ضریب تغییرات یا Coefficient Variance عدد CV% ≤ ۲ را نشان داد.

۱۲) کنترل کیفیت:

در این آزمایش، *Ribonuclease P* (*RNase P*) به عنوان کنترل داخلی یا ژن housekeeping در همان میکروتیوب تکثیر می‌شود و باید در تمامی میکروتیوب‌ها به جز میکروتیوب NTC در کانال زرد افزایش یابد.

۱۳) تداخل:

عوامل مداخله‌گر داخلی احتمالی برای نمونه‌های سرم از جمله میزان بالای تری‌گلیسیرید (TG > 1000 mg/dl)، بیلی‌روبین غیرمستقیم (Bili > 20 mg/dl) و هموگلوبین (Hb > 20 g/dl) مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج در تمام موارد با نتایج مورد انتظار هم‌خوانی داشت و هیچ تداخلی در ارزیابی انجام شده دیده نشد. به علاوه، بررسی‌های آزمایشگاهی و بیوانفورماتیک عدم وجود تداخل با سایر ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها را تایید کرد (سنجش اختصاصیت).

۱۴) دفع پسماندها:

- دفع پسماندها را مطابق با استانداردهای ابلاغی و با توجه به روش‌های توصیه شده موجود انجام دهید.
- پسماندهای با منشاء انسانی به ویژه نمونه‌های مورد استفاده برای تشخیص مولکولی Dengue Virus ممکن است احتمال آلودگی توسط میکروارگانیسم-های بیماری‌زا را که در نمونه‌های بالینی وجود دارند افزایش دهند و باید همانند زباله‌های زیستی، ابتدا اتوکلاو شده و سپس با احتیاط امحا گردند. هنگام برخورد و دفع چنین نمونه‌هایی، اقدامات احتیاطی جهانی را به کار گیرید.

۱۵) منابع:

- www.who.int/publications/i/item/9789241547871
- www.cdc.gov/dengue/hcp/diagnosis-testing

۱۶) علائم و توضیحات:

سری ساخت	LOT
شماره رفرنس	REF
تاریخ تولید	
تاریخ انقضا	
مطالعه بروشور	
استفاده در موارد تحقیقاتی	RUO
شرایط نگهداری	
آدرس شرکت	
دور از تابش آفتاب	
قرارگیری به سمت بالا	
علائم خطر	

جهت ارتباط با واحد پشتیبانی با شماره ۰۹۰۲۴۳۲۲۴۱۳ تماس بگیرید.

تاریخ آخرین بازبینی ۱۴۰۳/۰۴

شرکت دانش بنیان پژوهش و توسعه امیرپیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، طبقه ۳، واحد ۱

کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۹

021-22920776

co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com