



famtaQUANT HCV Real-Time PCR Kit

کیت تشخیص مولکولی و تعیین میزان ویروس هپاتیت C Real-Time PCR به روش

راهنمای سریع

Cat Number: 2040113 (24 Reactions)
2040114 (48 Reactions)
2040115 (96 Reactions)



مقدمه

هپاتیت C ویروسی (HCV) یکی از بیماری‌های مهم ویروسی است که به طور عمده کبد را تحت تأثیر قرار می‌دهد و می‌تواند منجر به مشکلات جدی مانند سیروز کبدی و سرطان کبد شود. ویروس HCV یک RNA ویروس از خانواده Flaviviridae است. این ویروس معمولاً از طریق خون آلوده منتقل می‌شود، به ویژه از طریق تبادل سرنگ‌ها، انتقال خون و از مادر به نوزاد. میزان شیوع این بیماری در سطح جهانی متفاوت است، ولی به طور کلی در مناطقی مانند آسیای جنوبی، خاورمیانه و کشورهای آفریقایی شایع‌تر است.

پس از ورود ویروس به بدن، عمدتاً کبد آلوده می‌گردد و ممکن است باعث التهاب مزمن کبدی شود. این التهاب مزمن می‌تواند به سیروز و در نهایت سرطان کبد منجر گردد. ویروس HCV به دلیل توانایی ایجاد تغییرات در ژنوم خود، قادر به فرار از پاسخ سیستم ایمنی بدن است.

کیت تشخیص مولکولی و تعیین میزان ویروس هپاتیت C با روش Quantitative Real-Time PCR این امکان را فراهم می‌کند که علاوه بر تشخیص مقادیر بسیار کم ویروس، تعداد ویروس را نیز در یک میلی لیتر از پلاسما تعیین نمایید.

محتویات کیت

جدول ۱) محتویات کیت

Color	Title	Volume per vial	24 Rxns	48 Rxns	96 Rxns
Blue	Buffer Mix ¹	390 µl	1	2	4
Blue	Enzyme Mix ²	78 µl	1	2	4
Purple	Primers & Probes ³	52 µl	1	2	4
Red	HCV Standard 1 ⁴	100 µl	1	1	1
Red	HCV Standard 2 ⁴	100 µl	1	1	1
Red	HCV Standard 3 ⁴	100 µl	1	1	1
Red	HCV Standard 4 ⁴	100 µl	1	1	1
Red	HCV Standard 5 ⁴	100 µl	1	1	1
Green	Internal Control ⁵	650 µl	1	1	2
White	DDW ⁶	600 µl	1	1	2

۱- بافر میکس، ۲- آنزیم میکس، ۳- حاوی پرایمرها و پروب های ویروس هپاتیت C و کنترل داخلی، ۴- حاوی ژنوم HCV با مقادیر مشخص (جهت رسم منحنی استاندارد)، ۵- IC (Internal Control)، ۶- DDW: آب. DNase-RNase Free

شرایط نگهداری

- کیت را تا زمان انقضا در فریزر -۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری نمایید.
- از کیتی که تاریخ انقضای آن گذشته است استفاده نکنید.
- از مخلوط کردن محلولها و موادی که شماره سریال (Lot Number) متفاوت دارند خودداری نمایید.
- ذوب مکرر (بیشتر از ۲ بار) اجزای کیت ممکن است بر عملکرد سنجش تأثیر بگذارد به همین منظور در ابتدا اجزای کیت را Aliquot کنید.

مواد و تجهیزات لازم

- دستگاه Real-Time PCR که دارای رنگ های خوانش FAM و JOE باشد.
- بلوک های آلومینیومی (Ice Racks) که از قبل در یخچال قرار گرفته و سرد باشند.
- سمپلرهای متغیر (0.5-10 µL و 10-100 µL)
- سر سمپلر فیلتردار DNase-RNase Free
- میکروتیوب DNase-RNase Free، 1.5 ml
- میکروتیوب های مخصوص PCR
- دستگاه میخی اسپین ورتکس
- کیت استخراج DNA ویروسی
- دستکش لاتکس بدون پودر

مشخصات محصول

کیت famtaQUANT HCV Real-Time PCR، یک کیت تشخیصی آزمایشگاهی مبتنی بر متد TaqMan Probe بوده، که به منظور تشخیص و تعیین میزان RNA اختصاصی ویروس هپاتیت C تولید گردیده است. تست دارای یک سیستم تکثیر هترولوگ (تکثیر ژن کنترل داخلی) جهت تعیین احتمال وجود ممانعت کننده‌های PCR و همچنین صحت عملکرد محلول های کیت می‌باشد.

پروب اختصاصی RNA ویروس هپاتیت C با رنگ FAM (کانال سبز) و پروب اختصاصی ژن کنترل داخلی (IC) با رنگ JOE (کانال زرد) نشان دار شده است.

استفاده از پروب های متصل شده به رنگ های متفاوت، امکان تشخیص همزمان RNA اختصاصی HCV و کنترل داخلی را به دستگاه Real-Time PCR می‌دهد.

دستگاه های Real-Time PCR

دستگاه های Real-Time PCR که دارای رنگ های خوانش FAM و JOE باشند، جهت استفاده با کیت حاضر مناسب هستند. در دستگاه ABI 7500 رنگ های آلترناتیو JOE، HEX یا VIC می‌باشند.

نمونه و شرایط نگهداری آن

- نمونه مناسب جهت انجام آزمون کمی HCV، پلاسما یا بیمار است.
- نمونه خون بیمار باید در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شده و نمونه‌ی جدا شده تا زمان استخراج در فریزر -۲۴ درجه سانتیگراد نگهداری شود.
- پیشنهاد می‌شود قبل از فریز کردن، نمونه‌ی خون را در دو حجم 200 µL جهت انجام تست و احیاناً تکرار آن، و یک حجم 1000 µL جهت Backup، در میکروتیوب های 1.5 mL، DNase-Free RNase جداسازی نمایید.
- به هیچ وجه از خون حاوی هیارین و EDTA در غلظت های بالا استفاده نشود.

احتیاط ها و هشدار ها

- این کیت در مصارف تشخیصی کاربرد دارد. استناد به نتایج این کیت بدون استفاده از سایر داده های بالینی، آزمایشگاهی و پاراکلینیکی توصیه نمی شود.
- رعایت اقدامات ایمنی عمومی در هنگام کار با نمونه های عفونی، محلول ها و ریجنتها الزامیست.
- قبل از انجام آزمون سطوح کاری را به وسیله وایتکس ۱۰٪ و سپس الکل ۷۰٪ ضدعفونی نمایید.
- سپس به مدت حداقل ۲۰ دقیقه لامپ UV هود و یا Workstation را روشن نموده تا فضای زیر آن ضد عفونی گردد.
- مقررات کار با نمونه های عفونی باید بر اساس رعایت اصول صحیح آزمایشگاهی (GLP) انجام گیرد.
- جهت جلوگیری از بروز آلودگی حین کار (Carry over contamination) استفاده از مکان های مجزا جهت آماده سازی و انجام واکنش ضروری است.
- هرگز درب ویال های تکثیر شده را باز نکنید. بعد از اتمام آزمون فوراً ویال های تکثیر شده را از دستگاه Real-Time PCR خارج نموده و در ظرف محتوی هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ قرار داده و نسبت به اتوکلاو آن اقدام و در فضایی خارج از آزمایشگاه معدوم نمایید.
- چنانچه نمونه های آزمایشگاه شما به تعداد کافی نمیباشند، به محض دریافت کیت آن را در حجم های کمتر Aliquot کرده و تا زمان استفاده، در فریزر و دمای -۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

روش استخراج ژنوم

توصیه می‌شود برای استخراج RNA از کیت های استخراج استاندارد و از برند های معتبر، یا از دستگاه های استخراج اتوماتیک از کمپانی های معتبر استفاده گردد.

نمونه پلاسما را از فریزر خارج کرده و اجازه دهید تا در دمای اتاق ذوب شود. سپس نمونه پلاسما را مدت کوتاهی ورتکس و اسپین نماید. سپس مقدار 200 µL از پلاسما را در یک میکرو تیوب 1.5 mL ریخته، با استفاده از کیت و یا دستگاه های استخراج اتوماتیک، RNA ویروس را از نمونه استخراج نمایید.

کیت استخراج QIAamp DSP Virus Spin Kit (کمپانی کیاژن) جهت استخراج RNA ویروس هپاتیت C توصیه می‌گردد.

توجه: برای اطمینان از صحت نتایج منفی Viral Load بیمار، ارزیابی عدم حضور ممانعت کننده های واکنش PCR و اطمینان از کیفیت استخراج، 12 µL از کنترل داخلی (IC) را در هنگام استخراج به Lysate (مخلوط بافر لیز کننده و پلاسما)، بعد از مرحله ی انکوباسیون و قبل از مرحله ی اضافه کردن اتانول در استخراج اضافه نمایید.

هرگز نمونه کنترل داخلی را مستقیماً به پلاسما اضافه نکنید.

در هر آزمون یک نمونه منفی را نیز جهت کنترل، استخراج کنید.

بهتر است حجم Elution Buffer نهایی 60 µL باشد.

تا زمان انجام آزمایش می توان RNA استخراج شده را در فریزر -۲۰ درجه سانتیگراد نگهدار نمود.

توجه: اگر حجم نمونه و یا Elution Buffer نهایی را تغییر دادید حتماً با کارشناسان فنی شرکت تماس بگیرید.

ویال های استاندارد (درب قرمز) را هرگز استخراج نکنید.

آماده سازی واکنش

تهیه مستر میکس

بر اساس تعداد واکنش هایی که میخواهید انجام دهید ویال های کیت شامل Buffer Mix، Enzyme، Mix، Primers & Probes، استانداردها (S1، S2، S3، S4، S5)، Internal Control و DDW را از فریزر خارج کرده و اجازه دهید تا بر روی Ice Rack به تدریج ذوب شوند و پس از اطمینان از ذوب شدن، ویال ها را به طور مختصر ورتکس و سپس اسپین نموده و بر اساس جداول زیر نسبت به تهیه مستر میکس اقدام کنید. (همگن کردن ویال آنزیم را با پیپتاژ نمودن و اسپین انجام دهید).

جدول ۵) غلظت ویال های استاندارد

Quantification Standards	Column 1 Concentration [IU/ μ l]	Column 2 Concentration [IU/ml]
Standard 1	1,000,000	300,000,000
Standard 2	100,000	30,000,000
Standard 3	10,000	3,000,000
Standard 4	1000	300,000
Standard 5	100	30,000

تفسیر نتایج (Result Interpretation)

نمونه های مثبت و استاندارد های کیت باید منحنی تکثیر سیگموتیدی را نشان دهند. هر نمونه که منحنی تکثیر را نشان بدهد به عنوان مثبت در نظر گرفته می شود. در صورتیکه نمونه بیمار دارای منحنی سیگموتیدی بوده و Ct کمتر از ۴۰ داشته باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن جهت تکثیر کنترل داخلی، مثبت تلقی می شود. در صورتیکه نمونه بیمار فاقد منحنی تکثیر برای ویروس HCV بوده ولی دارای منحنی تکثیر برای کنترل داخلی باشد این نمونه منفی در نظر گرفته می شود. اگر Ct کنترل داخلی نمونه ای دارای اختلاف قابل توجهی نسبت به سایر نمونه ها باشد، و یا کنترل داخلی در نمونه ای که لود ویروس پایینی را نشان می دهد بالا نرفته باشد، به احتمال زیاد لود ویروس به دست آمده جهت آن نمونه صحیح نبوده و در این صورت تکرار استخراج نمونه مورد نظر پیشنهاد می گردد.

در صورتیکه نمونه بیمار فاقد منحنی تکثیر برای هر دو رنگ خوانش FAM و JOE باشد، استخراج یا آزمایش آن نمونه میبایست تکرار شود.

توجه: دقت نمایید که شرط دارا بودن شکل سیگموتیدی برای تفسیر نتایج نمودار ضروری است. در دستگاه Rotor Gene Q می توانید جهت اصلاح شیب نمودار ها و مشاهده نمودارهای سیگموتیدی، گزینه Slope correction را روشن و یا خاموش نمایید.

جدول ۶) تفسیر نتایج یک آزمون

Detection Channel		Result Interpretation
FAM (HCV target)	JOE (Internal Control)	-----
Positive	Positive or Negative	Result is Positive
Negative	Positive	Target (HCV) Not Detected Result is Negative
Negative	Negative	PCR inhibition or reagent failure. Repeat test or Extraction again.

یادداشت:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

* برای دسترسی به دفترچه راهنما کد QR را اسکن نمایید.

این کیت براساس قوانین و مقررات گواهینامه ایزو 13458 تولید شده است.



آدرس: تهران، خیابان شریعتی، خیابان کدویی، کوچه طباطبایی، پلاک ۲

ایمیل پشتیبانی: support@famta.co

تلفن پشتیبانی: ۰۹۰۴ ۴۳۷ ۹۰۰۰

دقت نمایید که مراحل آماده سازی ویال آنزیم و میکس نهایی واکنش بایستی بر روی یخ انجام گیرد.

تهیه مستر میکس به دو صورت انجام می شود

اگر کنترل داخلی جهت اطمینان از عدم حضور ممانعت کننده های PCR بکار می رود، مستر میکس را بر اساس جدول 2 تهیه نمایید.

جدول ۲) آماده سازی میکس PCR به همراه کنترل داخلی

Number of Reactions (rxns)	1
Buffer Mix	15 μ L
Enzyme Mix	3 μ L
Primers & Probes	2 μ L
Internal Control	1 μ L
Master Mix Volume	15 μ L

اگر کنترل داخلی جهت کنترل مرحله استخراج و اطمینان از عدم حضور ممانعت کننده های PCR بکار می رود، ژنوم کنترل داخلی میبایست در هنگام استخراج اسید نوکلئیک به نمونه خون اضافه شده باشد (قبلا در قسمت استخراج ژنوم توضیح داده شد). در این صورت مستر میکس را بر اساس جدول ۳ تهیه نمایید.

جدول ۳) آماده سازی میکس PCR بدون کنترل داخلی

Number of Reactions (rxns)	1
PCR buffer Mix	15 μ L
Enzyme Mix	3 μ L
Primers & Probes	2 μ L
Master Mix Volume	15 μ L

اضافه کردن الگو

- مستر میکس آماده شده را به کمک پیتینگ و یا ورتکس آرام، هموزن و سپس اسپین نمایید.
 - مقدار 20 μ L از مستر میکس تهیه شده را به میکرو تیوب های مخصوص PCR که بر روی بلوک آلومینیومی سرد شده (Ice Rack) قرار دارند اضافه نمایید.
 - مقدار 10 μ L از RNA استخراج شده (برای بیماران)، همچنین از هریک از استاندارد ها را در میکرو تیوب های مربوطه اضافه نموده و حداقل ۲ بار و به آرامی پیتینگ نمایید.
- نکته:** برای جلوگیری از آلودگی حین کار به ترتیب لوله NTC، نمونه های بیماران و سپس لوله های استاندارد را آماده نمایید.
- سپس بلوک آلومینیومی سرد (Ice Rack) را به اتاقی که دستگاه Real-Time PCR قرار دارد منتقل کنید.

تنظیم برنامه دستگاه

- رنگ فلورسنت جهت گزارشگر FAM.HCV (Reporter) و رنگ فلورسنت جهت گزارشگر (Reporter) کنترل داخلی، JOE، است.
- نکته: بهتر است برنامه دمایی قبل از آماده کردن مستر میکس و اضافه کردن الگو، تنظیم گردد.

برنامه دمایی برای آزمون Real-Time PCR

جدول ۴) برنامه ی دمایی

	Temperature	Hold	Acquisition	Cycle
cDNA Synthesis	50°C	40 min	-----	1X
Initial denaturation and polymerase activation	95°C	15 min	-----	1X
Denaturation	95°C	20 sec	-----	45X
Annealing and elongation	57°C	40 sec	Yes	

تنظیمات اختصاصی دستگاه Rotorgene جهت بهینه سازی خوانش:

Gain optimization

Optimize Acquiring → perform optimization before 1st Acquisition on 57°C

وارد کردن غلظت استاندارد ها در نرم افزار دستگاه

غلظت استانداردها را بر اساس ستون ۱ و یا ستون ۲ جدول ۵ در نرم افزار دستگاه تنظیم کنید.

توصیه می شود که اعداد استاندارد ها را بر اساس ستون دوم تنظیم نمایید.

ATTCCTCGAGGACCAAGGCGTTCTAGCAGTCCAGATGACCAAAAGCTACCGAMTAGACCAATGAAAGATCTCTAGGAAGCT