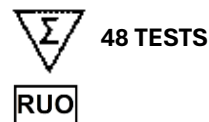


## RSV qPCR Detection Kit

سنجش ویروس سینسیشیال تنفسی در نمونه‌های سوآپ حلق و بینی  
با استفاده از روش Real-time PCR



### محتویات کیت

محتویات	حجم	دمای نگهداری
One Step RT qPCR Master Mix	480µl	-20°C
Primer & Probe Mix	100µl	-20°C
Positive Control	45µl	-20°C

### معرفی و کاربرد

کیت تشخیص ویروس سینسیشیال تنفسی تایپ A و B در نمونه‌های سوآپ حلق و بینی با روش Taq Man Real-time PCR می‌باشد.

ویروس سینسیشیال تنفسی (RSV) از خانواده پتوموویریده و جنس ارتوپتوموویروس، پوشش‌دار با RNA تک رشته‌ای، قطر 150-200 نانومتر و دارای تقارن مارپیچی می‌باشد. این ویروس در کودکان و افراد مسن می‌تواند باعث بیماری شدید و جدی مانند برونشیت، پنومونی و حتی مرگ گردد.

### اصول انجام کار

در این کیت، تشخیص ویروس سینسیشیال تنفسی (ژنوتایپ‌های A و B) از طریق افزایش شدت فلورسنت ناشی از تکثیر قطعه‌ی 70 جفت بازی محافظت شده از ژنوم ویروس (ژن N) در کانال FAM و به صورت تک مرحله‌ای طراحی گردیده است. این کیت حاوی کنترل داخلی (RNase P) در کانال HEX بوده که به کمک آن می‌توان وجود عوامل مهارکننده‌ی واکنش PCR، کارایی واکنش و صحت فرآیند استخراج را ارزیابی کرد.

### دستگاه‌های Real-time PCR سازگار با محصول

این کیت قابلیت استفاده در تمامی دستگاه‌های دارای کانال‌های FAM و HEX را دارا می‌باشد.

### حمل و نقل و شرایط نگهداری کیت

این محصول باید در دمای منفی 20 درجه سانتی‌گراد حمل و نگهداری شود. کیت مذکور تا اتمام تاریخ انقضای درج شده بر روی جعبه‌ی آن قابلیت استفاده دارد. جهت جلوگیری از کاهش حساسیت تست، از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت (بیش از 3 بار) خودداری گردد.

### شرایط نگهداری نمونه‌ها

جمع‌آوری نمونه باید مطابق پروتکل‌های استاندارد صورت گیرد. نمونه‌ها بایستی حداکثر طی 24 ساعت در دمای 2-8 درجه‌ی سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل شوند. حداقل نمونه‌ی مورد نیاز برای آزمایش 200 میکرولیتر می‌باشد.

### تجهیزات و مواد مورد نیاز

ردیف	تجهیزات و مواد
۱	سمپلر و سرسمپلر فیلتردار
۲	دستگاه Real-time PCR دارای کانال‌های خوانش رنگ‌های سبز و زرد
۳	کیت یا سیستم اتوماتیک استخراج اسید نوکلئیک (Cat.NO.: EX6066)
۴	میکروتیوب‌های مخصوص واکنش Real-time PCR

### انجام آزمایش Real-time PCR

میکروتیوب‌های آماده شده را در دستگاه Real-time PCR قرار دهید. کانال FAM را برای RSV A-B و کانال HEX را برای IC انتخاب نمایید و طبق پروتکل زیر برنامه‌ی دمایی را اجرا کنید. دمای 64°C برای خوانش رنگ‌های فلورسانس انتخاب می‌گردد.

cDNA Synthesis	50°C	20min	1 cycle
Pre-Denaturation	95°C	5min	1 cycle
PCR cycles	95°C	20sec	40 cycles
	64°C	30sec	

پیشنهاد: برای رسیدن به فاز Plateau در پیک نمونه‌هایی با کانت پایین، می‌توان تعداد سیکل را به 45 افزایش داد.

### نمونه‌های قابل قبول برای آزمون

نمونه‌های تنفسی فوقانی شامل غرغره گلو، سوآب بینی - حلقی، نازوفارنکس و اوروفارنکس، ترشحات یا مایع حاصل از شست‌وشوی انتهای بینی و حلق، مایع حاصل از شست‌وشوی ریه‌ها (BAL) و ترشحات نای و خلط برای آزمون مورد تایید می‌باشد.

### روش کار

#### استخراج اسیدنوکلئیک

سنجش عملکرد کیت بستگی به میزان و کیفیت RNA استخراج شده دارد. استخراج RNA بایستی طبق پروتکل کیت‌های معتبر موجود در بازار انجام شود. برای فرآیند استخراج، کیت Viral RNA & DNA Extraction Kit (Cat NO.: EX6066) دارای مجوز IVD از اداره کل تجهیزات پزشکی توصیه می‌شود.

#### پروتکل آزمون تشخیصی Real-Time PCR

ویال‌های حاوی اجزای واکنش را روی رک یخ قرار دهید تا ذوب شوند و پس از اسپین ویال‌ها اقدام به آماده‌سازی مخلوط واکنش به صورت زیر نمایید: دقت نمایید که علاوه بر نمونه‌ها، 2 ویال برای کنترل مثبت و کنترل منفی آماده نمایید.

اجزاء	Sample	Positive Control	NTC
One Step RT qPCR Master Mix	10µl	10µl	10µl
Primer & Probe Mix	2µl	2µl	2µl
Sample (RNA)	8µl	-	-
Positive Control	-	5µl	-
DNase Free Deionized Water	-	3µl	8µl

## آنالیز نتایج

### کنترل مثبت

در مرحله‌ی اول، عملکرد کنترل مثبت را بررسی کنید. Ct منحنی تکثیر کنترل مثبت بایستی کمتر از 35 ( $Ct < 35$ ) باشد.

### واکنش NTC

در شرایط ایده‌آل، نتیجه واکنش NTC، باید به صورت یک خط مسطح (نتیجه منفی) باشد که نشان‌دهنده عدم آلودگی مواد زمینه واکنش می‌باشد. منحنی تکثیر NTC در  $Ct \geq 38$  معتبر بوده و نتیجه آزمون از این نظر مورد تایید است و نیازی به تکرار آزمون نیست. در صورت مشاهده منحنی در  $Ct < 38$ ، نتایج نامعتبر بوده و آزمون بایستی مجدداً تکرار شود.

### کنترل داخلی IC

وجود منحنی تکثیر برای کنترل داخلی (IC)، نشان‌دهنده‌ی استخراج موفقیت‌آمیز RNA و نیز عملکرد و کیفیت مطلوب مواد بیولوژیکی واکنش می‌باشد.

در صورتیکه نمونه تست دارای منحنی IC با مقدار  $Ct \leq 37$  باشد، استخراج RNA و انجام واکنش مورد تایید است. شناسایی کنترل داخلی (RNase P) برای نمونه‌های منفی بیمار ضروری بوده و نشان‌دهنده کیفیت مناسب نمونه می‌باشد، در صورت مشاهده  $Ct < 37$  که می‌تواند بدلیل غلظت پایین RNA و یا وجود ممانعت کننده در واکنش باشد، پیشنهاد می‌شود استخراج نمونه تکرار شود و یا نمونه‌گیری مجدد انجام گیرد.

عدم شناسایی سیگنال کنترل داخلی در نمونه‌های مثبت با تیترا بالای ویروس می‌تواند ایجاد گردد که تیترا بالای ویروس منجر به کاهش یا عدم حضور سیگنال کنترل داخلی در نمونه‌های مثبت می‌شود.

## نمونه مورد آزمون

نمونه‌های RSV مثبت، بایستی دارای منحنی "سیگموئیدی" با  $Ct \leq 37$  باشند. اگر نمونه مورد آزمون دارای منحنی تکثیر با مقدار  $Ct > 37$  باشد، آزمون بایستی تکرار شود.

### تحلیل نتایج

سیگنال در کانال FAM	سیگنال در کانال HEX	نتیجه	تفسیر
$Ct \leq 37$	$Ct \leq 37$	معتبر	مثبت
$Ct \leq 37$	-	معتبر	مثبت
-	$Ct \leq 37$	معتبر	منفی
-	$Ct > 37$	نامعتبر	تکرار تست
-	-	نامعتبر	تکرار تست

### حساسیت تست

حداقل تعداد کپی قابل تشخیص در این تست 150 Copy/ml می‌باشد.

### اختصاصیت تست






کیت تشخیصی RSV qPCR Detection Kit شرکت تهران کاوش کلون (سیناکلون سابق) برای توالی ژن هدف RSV به صورت اختصاصی طراحی شده است. این کیت در بررسی، هیچ گونه واکنش متقاطعی با پاتوژن‌های تنفسی رایج زیر ندارد.

MERS Coronavirus; Influenza A viruses (H3N2 and H1N1); influenza B virus; Human Coronaviruses OC43, 229E, NL63; HKU1; Human adenovirus; Streptococcus pneumoniae; Haemophilus influenza; Staphylococcus aureus


آنالیز کمی نمودارها در شکل ۳ و ۴

ضریب CT	نمونه	رنگ	ردیف
24.91	کنترل مثبت	قرمز	1
28.26	نمونه بیمار	بنفش	2
27	کنترل داخلی	سبز	3
-	NTC واکنش	سیاه	4

علائم راهنماها

Signs	Definitions	Signs	Definitions
	Temperature range on product use		Name and address of the manufacturer of the product
	For Research Use Only		
	Product shipping conditions		Product technical code

**SinaClon**  
BioScience شرکت سیناکلون

 Unit 9, Rouyesh building, Science and Technology Park, Tarbiat Modares University, Pajouhesh Blvd, Tehran, Iran



+98219108211



www.sinaclon.com

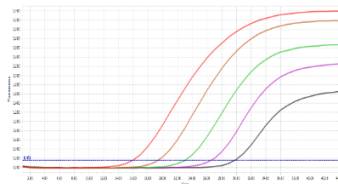


hi@sinaclon.com

(A)

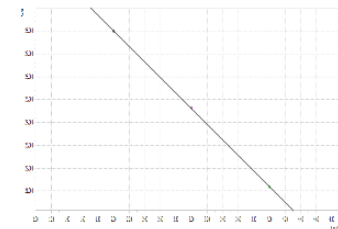
شکل ۱:

سری رقت از کنترل مثبت کیت در کانال سبز



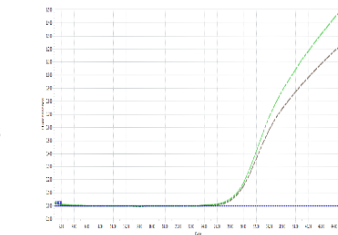
شکل ۲:

ضریب همبستگی واکنش  $(R^2)$ : 1.00  
شیب خط:  $-3/40$  بازده تست: 1/97



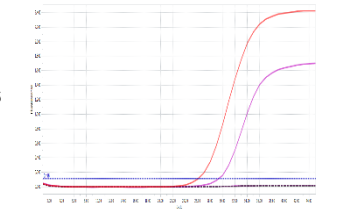
شکل ۳:

نتایج خوانش کانال HEX برای کنترل داخلی



شکل ۴:

نتایج خوانش کانال FAM برای نمونه مثبت RSV



(Y)