دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کمی

ویروس BK

با روش

Real-Time PCR

Doc. #: IFU-BK-01 Doc. Version: 03 Revision Date: 03-06-2023

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۳

شرح کیت و حیطه کاربرد ۳

اصول ۳

محتویات کیت ۴

نگهداری و انتقال کیت ۵

نکات احتیاط عمومی ۶

هشدارها و محدودیت‌ها ۶

نمونه گیری و نگهداری ۷

آماده سازی ۹

تنظیم واکنش ۹

برنامه ریزی دمایی ۹

آنالیز اطلاعات ۱۲

ارزیابی عملکرد (Performance Evaluation) ۱۲

واکنش متقاطع ۱۲

دقت (precision) ۱۳

حساسیت و اختصاصیت کلینیکال ۱۳

پشتیبان فنی ۱۳

نشانه‌ها ۱۴

اطلاعات تماس ۱۴

شماره رفرانس

- BONBK-24

شرح کیت و حیطه کاربرد

کیت Senmurv BK PCR یک سیستم آماده مصرف برای تشخیص DNA ویروس BK از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) در نمونه پلاسما است. مستر حاوی واکنش‌گرها و آنزیم‌هایی برای تکثیر اختصاصی قطعه ای به طول ۹٦bp از ژنوم BK بوده و برای تشخیص مستقیم امپلیکون مورد نظر از طریق کانال فلوروسنت Cycling Green در دستگاه‌هایRotor-Gene ۳۰۰۰ و Rotor-Gene ٦۰۰۰ طراحی گردیده است. بعلاوه، کیت Senmurv BK PCR حاوی سیستم ثانویه تکثیر هترولوگ برای تشخیص احتمال وجود مهارکننده واکنش PCR است. این امر از طریق شناسایی کنترل داخلی (Internal Control) در کانال فلوروسنت Cycling Orange صورت می‌پذیرد.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم پاتوژن است. در واکنش Real-time PCR محصول تکثیر شده از طریق رنگ‌های فلوروسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت real-time) تشخیص و مقدار کمی محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

اطلاعات پاتوژن

پلیوماویروس تنها جنس ویروس در خانواده Polyomaviridae است. ویروس های پلیوما واجد DNA دو رشته ای حلقوي به طول bp ۵۰۰۰، و به قطر ٤۰-۵۰ نانومتر و فاقد پوشش لیپوپروتئيني است. این ویروسها به صورت بالقوه سرطانزا (تومورزا) هستند. این ویروس اغلب به صورت نهفته در میزبان خود باقي مي ماند اما ممکن است تومورهایی را در یک گروه از گونه های مختلف یا یک میزبان با نقص سیستم ایمني ایجاد کنند. نام پلیوما به توانایی ویروس ها در تولید تومورهای چندگانه (پلی) اشاره دارد. دو مورد از پلیوماویروسها ، پلیوماویروس BK (ویروس BK، BKV) و پلیوماویروس JC (ویروس JC، JCV) عفونت های همه جانبه را در انسان ایجاد می کنند. ویروس JC، که می تواند سیستم تنفسی، کلیه ها یا مغز را

آلوده کند (گاهی اوقات باعث لکوسنسفالوپاتی چند کانونی پیشرونده کشنده می شود) و ویروس BK که عفونت تنفسی خفیفی ایجاد می کند به عنوان یک عامل بیماری زای قابل توجه در بیماران پیوند در حال ظهور است. علاوه بر این، وجود DNA ویروس BK در تومورهای اولیه مغز و لوزالمعده نشان می دهد که ممکن است دارای پتانسیل سرطان زایی باشد. ویروس BK که اپیتلیوم کلیه را آلوده می کند و تا زمانی که سرکوب سیستم ایمنی باعث فعال شدن مجدد نشود ، پنهان باقی می ماند. پس از فعال شدن مجدد، ویروس BK را می توان در ادرار با روش هایی که در حال حاضر در آزمایشگاه بالینی موجود است، تشخیص داد. مي توان بين عفونت زايي BK و بروز هر دو بيماري كليوي و كبد ارتباط برقرار كرد. پیشگیری از ویروس BK و فعال شدن مجدد ویروسی پنهان یک چالش برای تحقیقات ویروسی است. ویروس پلیومای BK یکی از علل مهم از بین رفتن پیوند در دریافت کنندگان پیوند کلیه است که به دلیل شروع، تداوم و عدم وجود عوامل ضد ویروسی مؤثر یا استراتژی های پیشگیری، همچنان چالش بزرگی را برای پزشکان ایجاد می کند.

محتویات کیت

Title	24 Tests
	Volume per Vial
BK Master Mix	360µl/tube × 1
BK Std1 5×10^4	300 µl/tube × 1
BK Std2 5×10^3	300 µl/tube × 1
BK Std3 5×10^2	300 µl/tube × 1
BK Std4 5×10^1	300 µl/tube × 1
Internal control (IC)	300 µl/tube × 1
Nuclease-Free Water	250 µl/tube × 1

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه جایی کیت از یونولیت با درب و یخخشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت دردمای۴ درجه سانتیگراد هیچگاه نباید بیشتر از یکساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل برروی بسته‌های یخزده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و درنتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
- ✓ از قراردادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.

مواد و تجهیزات مورد نیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود؛

۱. کیت استخراج DNA
۲. سمپلر قابل تنظیم دراندازه هاش مختلف و نوك سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزي
٤. بلوك خنك كننده
٥. وایتکس ۱۰ درصد
٦. گان و دستکش
۷. دستگاه Rotor-Gene با کانال‌های فلوروسنت مخصوص (FAM) Cycling Green و (Texas Red) Cycling Orange
۸. نرم افزار Rotor-Gene Q نسخه ۱٫۷٫۹٤ ، نرم افزار Rotor-Gene ٦۰۰۰ نسخه ۱٫۷٫٦٥, ۱٫۷٫۸۷, ۱٫۷٫۹٤ و نرم افزار Rotor-Gene ۳۰۰۰ نسخه ٦٫۰٫۲۳ و یا بالاتر.
۹. استریپ و کپ ۰٫۱ ml برای استفاده در روتور ۷۲ چاهکی و یا لوله‌های PCR 0.2 ml برای روتورهای ۳٦ چاهکی

نکات احتیاط عمومی

کاربر باید همیشه به نکات زیر توجه کند:

۱. استفاده از سر سمپلرهای فیلتردار وRNase & DNase free
۲. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای BKV (نمونه های گرفته شده از مریض، کنترلها و محصولات حاصل از PCR) باید در محلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده سازی BKV master mix صورت پذیرد.
۳. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
٤. بعد از ذوب شدن ، کلیه مواد (به ویژه استانداردهای کیت) را به خوبی پیپتاژ نمایید و به طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طور کامل توصیه میشود.
٥. تمام مراحل مربوط به تهیه master mix باید بر روی یخ یا جعبه های سرد(cooling box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به master mix بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.
٦. هنگام کار با مواد شیمیائي، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهي، دستکش یکبار مصرف، و عینکهاي محافظ داشته باشید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP[1] توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)[2] انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-۲ انجام شود.استفاده از دستورالعمل : Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated
۲. پیشنهاد می شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین طور بعد از کار لامپ UV زده شود .
۳. پیشنهاد می شود محل استخراج DNA ، آماده سازی مخلوط واکنش از فضای آماده کردن اضافه کردن نمونه و نمونه استاندارد جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید .
٤. پس از آماده سازی مخلوط واکنش ، آن را در تاریکی نگهداری نمایید .

[1] Good Laboratoty Practice
[2] Personal Protective Equipment

نمونه گیری و نگهداری

نمونه ها باید با احتیاط بسیار گرفته شده و نهایت دقت در حمل و نقل و کار با آنها صورت گیرد، زیرا نمونه ها دارای ریسک بالقوه برای آلوده کردن فرد و محیط با ویروس BK میباشد. مطلوب ترین نوع نمونه، پلاسما با ضد انعقاد سیترات یا 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 سیتراته یا همراه EDTA دارای هیچ گونه ضمانت عملکردی نبوده و سازنده در مورد آن هیچ گونه مسئولیتی ندارد.

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

نگهداری نمونه های گرفته شده

نمونه خون گرفته شده باید در اسرع وقت (کمتر از شش ساعت از زمان نمونه گیری) پلاسما گیری شود. برای این منظور نمونه خون را به مدت ۲۰ دقیقه در۱۶۰۰-۸۰۰g سانتریفوژ کنید و پلاسمای جدا شده را به تیوپ پلیپروپیلن 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 در٤ درجه سانتی گراد ، هفتهها در ۲۰- درجه سانتی گراد و ماهها و حتی سال ها در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرد.

انتقال نمونه

در طی انتقال نمونه به نکات 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 نمونه های خون کامل باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و نمونه های پلاسمای جدا شده در ۲۰- درجه سانتی گراد صورت گیرد.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

کنترل داخلی (Internal Control)

این کیت به همراه یک کنترل داخلی برای مصرف کننده نهایی تهیه شده است. این امر به کاربر نهایی اجازه میدهد تا هم فرآیند تخلیص را چک کند و هم احتمال وجود مواد مهار کننده PCR را بررسی نماید. به طور کل در این حالت کنترل داخلی موجود در کیت را به مقدار۲/. μl به ازاء هر ۱μl از حجم حل کردن نهایی ژنوم ویروس BK اضافه میشود. برای مثال اگر ژنوم تخلیص شده از BK را در ۵۰μl آب حل میکنیم

باید در هنگام تخلیص پلاسمای مربوط به آن به پلاسما µl ۱۰ کنترل داخلی اضافه کنیم. به بیان دیگر حجم کنترل داخلی اضافه شده تنها تابعی از میزان الوشن (elution) نهایی میباشد. این کنترل داخلی را میتوان به طور مستقیم به بافر لیز اضافه کرد و یا آن را به مخلوط بافر لیز و پلاسما اضافه نمود. این نکته قابل ذکر است که اضافه کردن کنترل داخلی به بافر لیز یا مخلوط بافر لیز و پلاسما باید به صورت تازه صورت گیرد. همچنین کنترل داخلی به هیچ عنوان نباید به خود نمونه به صورت مستقیم و در غیاب بافر لیز اضافه شود. نحوه تخلیص در حین اضافه کردن کنترل داخلی به صورت شماتیک در جدول ۲ نشان داده شده است. همچنین میتوان کنترل داخلی را تنها در طی مرحله PCR اضافه کرد که در این حال هیچ گونه کنترل بر روی مرحله تخلیص وجود نخواهد داشت. در این حالت µl ۱۰از کنترل داخلی به µl ۱۵از master mix اضافه شده و سپس مقدار µl ۱۵ از این مخلوط با µl ۱۰ از نمونه تخلیص شده مخلوط میگردد.

اگر از IC به عنوان یک کنترل مهار Q-PCR استفاده می شود ، اما نه به عنوان یک کنترل برای روش آماده سازی نمونه ، Master Mix را مطابق به صورت زیر تنظیم کنید:

	1	12
Super BK mix 4X	15 µl	180 µl
Internal Control	1 µl	12 µl
Volume Master Mix	16 µl	192 µl

آماده سازی

در صورتیکه کنترل داخلی را در مرحله استخراج اضافه کرده اید، مقادیر لازم برای آماده سازی هر لوله تست یا استاندارد را مطابق جدول زیر آماده کنید.

جدول ۳. اگر IC طی مراحل آماده سازی نمونه اضافه شد ، Master Mix را مطابق با جدول زیر تنظیم کنید:

Number of Reactions (rxns)	1	12
Super BK mix 4X	15 µl	180 µl
Volume Master Mix	15 µl	180 µl

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. تیوبNTC برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.

تنظیم واکنش

Reaction Setup	Volume
Master Mix	15 µl
Sample or Control	10 µl
Total Volume	25 µl

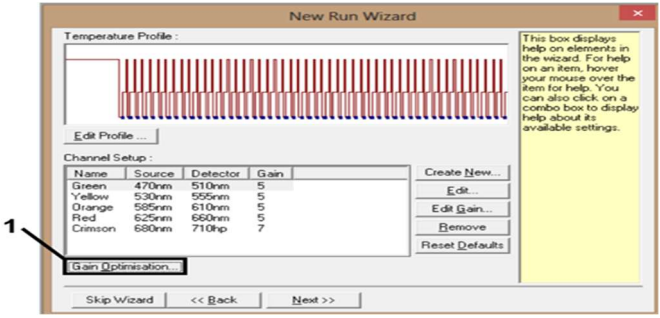
برنامه ریزی دمایی

۱. به منظور انجام تست باید برنامه دمایی زیر برای دستگاه تعریف شود. سنجش طیف نشری (acquisition) باید هم در کانال سبز (مربوط به سیگنال دریافتی از ژنوم BKV) و هم در کانال نارنجی (مربوط به سیگنال دریافتی از کنترل داخلی) انجام شود. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه Rotor Gene به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول صفحه بعد آورده شده است.

	Temperature	Incubation Time	Cycle
Pre-Denaturation	95 ℃	3 min	1
Denaturation	95 ℃	15 sec	45
Annealing and acquisition on channel Green and Orange	58 ℃	45 sec	

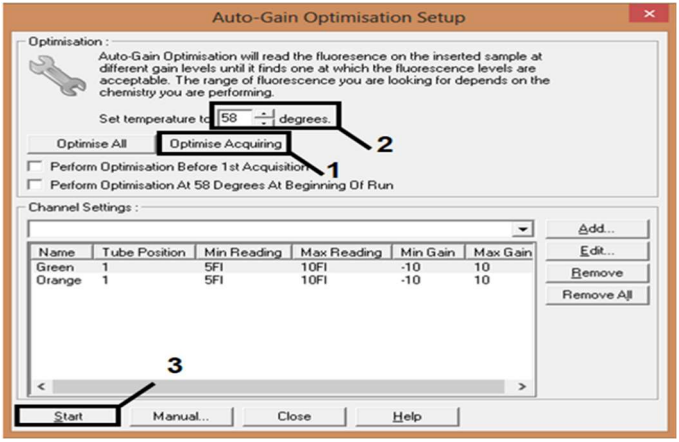
۲. علاوه بر تعریف دمایی دستگاه که در قسمت بالا آمده است دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم گردد.

۳. از همین رو پس از تنظیم دمایی دستگاه و معرفی کانال های سبز و نارنجی باید به قسمت تنظیم مقدار نشر فلورسانس (Gain optimization) مراجعه کرد(شکل ۱)



شکل ۱ . شروع تنظیمات مربوط به شدت فلورسانس. بعد از تنظیم دما و معرفی کانالهای سبز و نارنجی برای تنظیم شدت فلورسانس وارد Gain Optimization شوید.

٤. سپس با کلیک بر روی (optimize acquiring) و کلیک ok بر روی پنجرهای باز شده ۲ کانال سبز و نارنجی به لیست صفحه اضافه میشود. پس از زدن کلیک perform optimization befor 1st acquisition ، کلیک start را فشار دهید (شکل ۲). در این حالت کلیه نمونه ها باید در دستگاه چیده شده باشد.



شکل ۲. مراحل تنظیم شدت فلورسانس با عدد نشان داده شده است. برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه کنید.

تعیین تعداد ژنوم ویروس BK تخلیص شده

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 μl 10 از ژنوم تخلیص شده با μl ۱۵ از master mix 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 در هر بار انجام تست باید به همراه نمونه های 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.

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

آنالیز اطلاعات

آنالیز اطلاعات در دستگاه Rotor-gene ۶۰۰۰ و Rotor-gene ۳۰۰۰ باید توسط نرم افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

حد آستانه (Threshold) را بر روی Baseline و در۰٫۰۲ = Th قرار دهید، سپس نتایج را به صورت زیر تفسیر کنید:

سیگنال فلورسانس در کانال (A.FAM=green) کاملا مشخص است.

نتیجه تست برای ویروس BK مثبت است و نمونه تخلیص شده از پلاسما حاوی ویروس BK بوده است.
در این حالت، وجود سیگنال فلورسانس در کانال Orange اهمیت ندارد زیرا در صورت بالا بودن غلظت اولیه ژنوم ویروس BK سیگنال در کانال Orange میتواند بسیار ضعیف باشد یا اصلا وجود نداشته باشد.

۱- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال (A.FAM=Green channel) مشاهده نمیشود. در همین حین سیگنال در کانال Orangeمربوط به کنترل داخلی قابل مشاهده است.

این حالت نشان دهنده عدم وجود ویروس BK در نمونه پلاسما میباشد. همچنین مثبت بودن سیگنال حاصل از کانال Orange وجود هر گونه مهار کننده واکنشPCR را منتفی میکند.

۲- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال A.FAM و کانال Orange قابل مشاهده نیست.

در این حالت هیچ گونه نتیجه گیری در مورد تست نمی توان انجام داد. تست باید دوباره تکرار شود.

ارزیابی عملکرد (Performance Evaluation)

واکنش متقاطع

کیت Senmurv BK PCR از لحاظ ایجاد واکنش متقاطع با سایر عوامل بیماری زا ارزیابی شد. هیچ یک از عوامل بیماریزای آزمایش شده واکنش متقاطع نشان ندادند.

جدول ۱: کیت Senmurv BK PCR با هیچ یک از عوامل بیماری زا زیر واکنش نشان نمی دهد:

• Herpes simplex virus 2 (HSV-2)	• Cytomegalovirus (CMV)
• Hepatitis A virus (HAV)	• Epstein-Barr virus (EBV)
• Hepatitis B virus (HBV)	• Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
• Hepatitis D virus (HDV)	• Parvovirus B19
• Hepatitis E virus (HEV)	• Dengue virus (DENV)
• Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)	• Human T-lymphotropic virus I (HTLV-I)
• Human T-lymphotropic virus II (HTLV-II)	• Varicella-zoster virus
• Simian virus 40	• JC virus

دقت (precision)

مطابق نتایج آنالیزهای انجام شده، دقت کیت حاضر بین ۵۰-۶۰ IU/mL می باشد.

حساسیت و اختصاصیت کلینیکال

مطابق نتایج، حساسیت کلینیکی کیت ۹۹٪ و اختصاصیت کلینیکی کیت ۱۰۰٪ به دست آمده است .

پشتیبان فنی

برای پشتیبانی فنی لطفا با تلفن های شرکت تماس حاصل فرمایید .

نشانه‌ها

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Concult Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficent for <n> tets	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته -گروه سین مورو

دفتر مرکزی :تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار 24 متری سعادت آباد

خیابان حیدرنیا(دوم شرقی)، پلاک 9، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی :1997775555 پشتیبان فنی :09301821601

تلفن های تماس :02122082120

Web Site: www.Senmurv.co Email: info@senmurv.ir