



Instruction for Use
BK Detection RT-PCR Kit

با روش

Real-Time PCR

Cat-No : BONBK -24

**STEM
CELL
TECHNOLOGY**
شرکت فناوری بن یاخته

Doc. # : IFU-BK-01 Doc. Version : 04 Revision Date : 1403-08-08

فهرست مطالب

شماره رفرانس.....	۳
شرح کیت و حیطه کاربرد.....	۳
اصول.....	۳
اطلاعات پاتوزن.....	۳
محتویات کیت.....	۵
نگهداری و انتقال کیت.....	۵
نکات احتیاط عمومی.....	۷
هشدارها و محدودیت‌ها.....	۷
نمونه‌گیری و نگهداری.....	۸
برنامهریزی دمایی.....	۱۴
آنالیز اطلاعات.....	۱۸
رفع مشکل.....	۱۹
ارزیابی آنالیتیکال.....	۲۱
اختصاصیت آنالیتیکال.....	۲۱
واکنش متقاطع.....	۲۱
حساسیت آنالیتیکال (پایین ترین حد تشخیص).....	۲۲
دامنه خطی.....	۲۲
دقت.....	۲۲
حساسیت و اختصاصیت کلینیکال.....	۲۲
پشتیبان فنی.....	۲۳
نشانه‌ها.....	۲۳
اطلاعات تماس.....	۲۴

- BONBK-24

شرح کیت و حیطه کاربرد

کیت BK qPCR یک سیستم آماده مصرف برای تشخیص DNA ویروس BK از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در نمونه پلاسما است. مستر حاوی واکنش‌گرها و آنزیم‌هایی برای تکثیر اختصاصی قطعه‌ای به طول ۹۶bp از ژنوم BK بوده و برای تشخیص مستقیم امپلیکون موردنظر از طریق کانال فلورسنت Cycling Green در دستگاه‌های Rotor-Gene ۳۰۰۰ و Rotor-Gene ۶۰۰۰ طراحی گردیده است. بعلاوه، کیت BK qPCR Senmurv حاوی سیستم ثانویه تکثیر هترولوگ برای تشخیص احتمال وجود مهارکننده واکنش PCR است. این امر از طریق شناسایی کنترل داخلی (Internal Control) در کانال فلورسنت Cycling Orange صورت می‌پذیرد.

اصول

تشخیص پاتوژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم پاتوژن است. در واکنش Real-time PCR محصول تکثیرشده از طریق رنگ‌های فلورسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلورسنت در حین واکنش PCR (به صورت real-time) تشخیص و مقدار کمی محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله‌های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

اطلاعات پاتوژن

پلیومایروس متعلق به خانواده Polyomaviridae می‌باشد. ویروس‌های پلیوما واجد DNA دو رشته‌ای حلقوی به طول ۵۰۰۰ bp و به قطر ۴۰-۵۰ نانومتر و فاقد پوشش لیپوپروتئینی است. این ویروس‌ها به صورت بالقوه سرطان‌زا (تومور زا) هستند. این ویروس اغلب به صورت نهفته در میزبان خود باقی می‌ماند اما ممکن است تومورهایی را در یک گروه از گونه‌های مختلف یا یک میزبان با نقص سیستم ایمنی ایجاد کنند. نام پلیوما به توانایی ویروس‌ها در تولید تومورهای

چندگانه (پلی) اشاره دارد. دو مورد از پلیوماو ویروسها، پلیوماو ویروس BK (ویروس BK، BKV) و پلیوماو ویروس JC (ویروس JC، JCV، JC) عفونت‌های همه‌جانبه را در انسان ایجاد می‌کنند. ویروس JC، می‌تواند سیستم تنفسی، کلیه‌ها یا مغز را آلوده کند (گاهی اوقات باعث لکوسنسفالوپاتی چند کانونی پیشرونده کننده می‌شود). ویروس BK اغلب در دوران کودکی فرد را مبتلا می‌کند و بیماری خفیف تنفسی ایجاد می‌کند. اما در طول زندگی فرد، به‌صورت یک عفونت نهفته در بافت‌های مختلف بدن نهفته باقی می‌ماند و کلیه مهم‌ترین آن است. لذا، BK در بزرگسالان با شیوع سرمی بیش از ۸۰٪ وجود دارد. این ویروس، در شرایط سرکوب سیستم ایمنی (همانند شرایطی که بیماران دریافت‌کننده پیوند با آن روبه‌رو هستند) دوباره فعال می‌شود و شروع به تکثیر می‌کند و مجموعه‌ای از فرایندها را آغاز می‌کند که به لیز سلولی و تولید ویروسی منجر می‌شود. بنابراین ویروس پلیوما BK یکی از علل مهم از بین رفتن پیوند در دریافت‌کنندگان پیوند کلیه می‌شود که به دلیل شروع، تداوم و عدم وجود عوامل ضدویروسی مؤثر یا استراتژی‌های پیشگیری، همچنان چالش بزرگی را برای پزشکان ایجاد می‌کند. پس از فعال شدن مجدد، ویروس BK را می‌توان در ادرار با روش‌هایی که در حال حاضر در آزمایشگاه بالینی موجود است، تشخیص داد.

محتویات کیت

Title	24 Tests
	Volume per Vial
BK Master Mix	360µl/tube × 1
BK Std1 : 1.2×10^4 IU/µl	100 µl/tube × 1
BK Std2 : 1.2×10^3 IU/µl	100 µl/tube × 1
BK Std3 : 1.2×10^2 IU/µl	100 µl/tube × 1
BK Std4 : 1.2×10^1 IU/µl	100 µl/tube × 1
Internal control (IC)	300 µl/tube × 1
Nuclease-Free Water	250 µl/tube × 1

جدول ۱ : محتویات کیت

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 بخ خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی گراد هیچ گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل بر روی بسته های یخ زده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان طور که روی برچسب بسته بندی 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 در نتیجه عدم کارایی کیت می‌شود. بیش از دو بار منجمد و ذوب کردن کیت به هیچ وجه توصیه نمی‌گردد.
 - ✓ از قرار دادن 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 به‌طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به‌طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.
- مواد و تجهیزات موردنیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود؛

۱. کیت استخراج DNA از خون
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه هاش مختلف و نوک سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفیوژ رومیزی
۴. بلوک خنک‌کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. دستگاه Rotor-Gene با کانال‌های فلورسنت مخصوص Cycling Green و Cycling Orange و یا فلورفورهای A.FAM و A.Texas Red
۸. نرم افزار Rotor-Gene Q نسخه ۱/۷/۹۴ ، نرم افزار Rotor-Gene ۶۰۰۰ نسخه ۱/۷/۸۷، ۱/۷/۹۴ و نرم افزار Rotor-Gene ۳۰۰۰ نسخه ۱/۷/۲۳ و یا بالاتر.
۹. استریپ و کپ 0.1 ml برای استفاده در روتور ۷۲ چاهکی

نکات احتیاط عمومی

کاربر باید همیشه به نکات زیر توجه کند:

۱. از سر سمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده نمایید.
۲. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای BKV (نمونه‌های گرفته‌شده از مریض، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR) باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده‌سازی master mix BKV صورت پذیرد.
۳. همه مواد موردنیاز کیت قبل از شروع کار باید به‌طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.
۴. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد (به‌ویژه استانداردهای کیت) را به‌خوبی پیتاژ نمایید و به‌طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به‌طور کامل توصیه می‌شود.
۵. تمام مراحل مربوط به تهیه master mix باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (cooling box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به master mix بعد از برداشتن مقدار موردنیاز از آن باید به‌سرعت به فریزر منتقل شود.
۶. هنگام کار با مواد شیمیایی، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یک‌بار مصرف، و عینک‌های محافظ داشته باشید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. کلیه نمونه‌ها عفونی بوده بنابراین تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP¹ توسط پرسنل آموزش‌دیده دارای پوشش حرفه‌ای و محافظ (PPE²) انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود. از دستورالعمل زیر استفاده نمایید:
Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated
۲. پیشنهاد می‌شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین‌طور بعد از کار لامپ UV زده شود.

¹ Good Laboratory Practice

² Personal Protective Equipment

۳. پیشنهاد می‌شود محل استخراج DNA، آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای آماده کردن اضافه کردن نمونه و نمونه استاندارد جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید.
۴. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

نمونه‌گیری و نگهداری

۱. نمونه خون باید با احتیاط بسیار گرفته شده و نهایت دقت در حمل و نقل و کار با آنها صورت گیرد، زیرا نمونه‌ها دارای ریسک بالقوه برای آلوده کردن فرد و محیط با ویروس BK می‌باشد.
۲. مطلوب‌ترین 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 کاملاً مورد تایید می‌باشد.
۳. برای امر تشخیص و تعیین مقدار ویروس BK مطلوب‌ترین نوع نمونه، پلاسما با ضد انعقاد سیترات یا EDTA هست. که این نوع نمونه برای این کیت به طور کامل مورد بررسی قرار گرفته و کاملاً مورد تایید می‌باشد. سایر انواع نمونه غیر از پلاسمای سیتراته یا همراه EDTA دارای هیچ‌گونه ضمانت عملکردی نبوده و سازنده در مورد آن هیچ‌گونه مسئولیتی ندارد.
۴. سایر انواع نمونه غیر از پلاسمای سیتراته یا همراه EDTA دارای هیچ‌گونه ضمانت عملکردی نبوده و سازنده در مورد آن هیچ‌گونه مسئولیتی ندارد.
۵. توجه: اگر چه هپارین یکی از پر کاربرد ترین مواد ضد انعقاد می‌باشد به هیچ عنوان نباید برای نمونه‌های خونی که برای آنالیز توسط این کیت مورد استفاده قرار می‌گیرد به کار رود.
۶. نمونه خون گرفته شده باید در اسرع وقت (کمتر از شش ساعت از زمان نمونه‌گیری) پلاسما گیری شود. برای این منظور نمونه خون را به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۶۰۰-۸۰۰ سانتریفوژ کنید و پلاسمای جدا شده را به تیپ پلی پروپیلن 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 در ۴ درجه سانتی‌گراد، هفته‌ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد و ماه‌ها و حتی سال‌ها در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

۷. نتایج منفی کاذب می‌توانند به دلیل حضور افزایش غلظت مهارکننده‌های واکنش PCR، نمونه‌گیری نامناسب، استخراج DNA غیراستاندارد، انتقال نامناسب نمونه باشد و یا از غلظت کم نمونه ناشی گردد.
۸. اگرچه هپارین یکی از پرکاربردترین مواد ضد انعقاد می‌باشد به هیچ‌عنوان نباید برای نمونه‌های خونی که برای آنالیز توسط این کیت مورد استفاده قرار می‌گیرد به کار رود.
۹. اگر احتمال تأخیر در استخراج نمونه‌ها وجود دارد، آن‌ها را در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر نگهداری نمایید.
۱۰. نوکلئیک اسیدهای استخراج شده باید در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر نگهداری شوند.
۱۱. نمونه‌هایی که ۴ روز یا بیشتر در دمای ۴-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده یا در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر فریز نشده‌اند، قابل استفاده برای آزمایش نمی‌باشد.
- ایمنی زیستی در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی و زیست-پزشکی چاپ پنجم را مطالعه فرمایید.

<http://www.cdc.gov/biosafety/publications>

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 در ۱۶۰۰-۸۰۰ 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 در ۴ درجه سانتی‌گراد، هفته‌ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد و ماه‌ها و حتی سال‌ها در ۷۰- درجه سانتی‌گراد 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.

عوامل تداخلی

HCl (1N)، هپارین، دانه های سیلیس (1 μ l)، خون (1 μ l)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر) و بافر لیز عملکرد آزمایش را مهار می کنند. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل ردیابی 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 می دهد تا هم فرآیند تخلیص را چک کند و هم احتمال وجود مواد مهار کننده PCR را بررسی نماید.

این کنترل داخلی را می توان در زمان استخراج 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.

✓ حجم کنترل داخلی اضافه شده تنها تابعی از میزان الوشن (elution) نهایی می باشد.

به طور کل در این حالت کنترل داخلی موجود در کیت را به مقدار $2 \mu\text{l}$ / به ازاء هر $1 \mu\text{l}$ از حجم حل کردن (elution) نهایی ژنوم ویروس BK اضافه می شود.

برای مثال اگر ژنوم تخلیص شده از BK را در $50 \mu\text{l}$ آب (elution) حل می کنیم باید در هنگام تخلیص پلاسمای مربوط به آن به بافر لیز $10 \mu\text{l}$ کنترل داخلی اضافه کنیم.

- 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 $1 \mu\text{l}$ از کنترل داخلی به $15 \mu\text{l}$ از master mix اضافه شده و سپس مقدار $15 \mu\text{l}$ از این مخلوط با $10 \mu\text{l}$ از نمونه تخلیص شده مخلوط می گردد.

آماده‌سازی

آماده‌سازی با دو روش صورت می‌گیرد :

۱. در صورتی که کنترل داخلی (IC) را در مرحله استخراج و طی مراحل آماده‌سازی اضافه کرده‌اید، به ازای هر نمونه مقدار $15\ \mu\text{l}$ از MasterMix-BK را برای هر تست در نظر بگیرید.

۲. اگر IC را در مرحله استخراج اضافه نکردید و می‌خواهید در مرحله PCR به‌عنوان کنترل‌کننده مهار Realtime-PCR استفاده کنید، Master Mix را مطابق توضیح تهیه نمایید:

ابتدا ۱ میکرو لیتر از کنترل داخلی را به MasterMix-BK مطابق جدول زیر اضافه کنید و سپس از این مخلوط $15\ \mu\text{l}$ میکرو لیتر به ازای هر واکنش استفاده نمایید (جدول ۲).

Number of Reactions (rxns)	Volume
BK Master Mix	$15\ \mu\text{l}$
Internal Control	$1\ \mu\text{l}$
<u>Final Volume</u>	<u>$16\ \mu\text{l}$</u>

جدول ۲: آماده‌سازی میکس با احتساب کنترل داخلی

از $16\ \mu\text{l}$ به مقدار $15\ \mu\text{l}$ به ازاء هر نمونه برداشته شود .

نکته: لازم به ذکر است که در هر بار انجام تست یک لوله به‌عنوان (No Template Control (NTC) باید گذاشته شود. بر اساس جدول فوق در NTC به‌جای نمونه استخراج‌شده آب استفاده می‌شود. تیوب NTC برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.

اضافه کردن الگو

پس از آماده سازی محلول ها و انتقال آن به تیوب های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۱۰ میکرو لیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسیدنوکلئیک، ۱۰ میکرو لیتر از نمونه های استاندارد و ۱۰ میکرو لیتر از نمونه های بیمار را به تیوب های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه ها را نام گذاری کنید (جدول ۳).

Reaction Setup	Volume
Master Mix	15 μ l
Sample or Control	10 μ l
<u>Total Volume</u>	<u>25 μl</u>

جدول ۳: الگوی اضافه کردن نمونه

برنامه ریزی دمایی

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 BK) و هم در کانال نارنجی (مربوط به سیگنال دریافتی از کنترل داخلی) انجام شود.

مقادیر دمایی هر قسمت در کادر زیر آورده شده است. علاوه بر تعریف دمایی، دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم گردد.

	Temperature	Incubation Time	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing and acquisition on channel Green (FAM) and Orange (Texas Red)	58°C	45 sec	

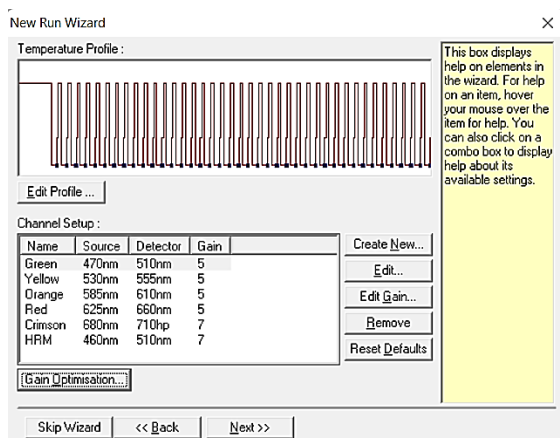
جدول ۴: برنامه‌ی تنظیم دمایی

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

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها

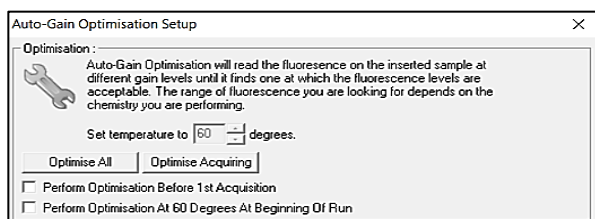
دستگاه Rotor-Gene

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱)



شکل ۱. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimize Acquiring برای هر دو کانال بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



شکل ۲. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene

همچنین Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب اول (که حاوی مسترمیکس به همراه IC و STD1 است) انجام شود.

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisition را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۳).

Auto-Gain Optimisation Channel Settings



Channel Settings :

Channel : Green Tube Position : 1

Target Sample Range : 5 FI up to 10 FI.

Acceptable Gain Range: -10 to 10

OK Cancel Help

Optimisation :

Auto-Gain Optimisation will read the fluorescence on the inserted sample at different gain levels until it finds one at which the fluorescence levels are acceptable. The range of fluorescence you are looking for depends on the chemistry you are performing.

Set temperature to 60 degrees.

Optimise All Optimise Acquiring

☒ Perform Optimisation Before 1st Acquisition

☐ Perform Optimisation At 60 Degrees At Beginning Of Run

شکل ۳. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene

تنظیم دستگاه Rotor-Gene جهت آنالیز نتایج

۱. آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در هر کانال رنگی، آستانه را در بازه ی ۰/۰۲ قرار دهید.
۲. از پنجره Quantitation Analysis گزینه ی Slope Correct را انتخاب نمایید.
توجه: دستگاه های دیگر دارای تنظیمات خودکار می باشند.

تعیین تعداد ژنوم ویروس BK تخلیص شده

استانداردهای تأمین شده در این کیت معادل یک نمونه تخلیص شده با تعداد کپی ویروس کاملاً مشخص است. از آنجاکه از هر نمونه تخلیص شده مقدار ۱۰ میکرو لیتر از ژنوم تخلیص شده با ۱۵ میکرو لیتر از MasterMix مخلوط می شود باید همین روند به طور مشابه برای نمونه های استاندارد نیز اعمال گردد. برای ترسیم منحنی استاندارد هر چهار استاندارد موجود 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 نمونه های مجهول تعیین گردد. برای انجام این امر باید استانداردها به عنوان استاندارد در برنامه تعریف شوند و مقدار معادل استاندارد بر اساس فرمول زیر محاسبه شده و در نرم افزار دستگاه وارد شود.

✓ استانداردهای تأمین شده در کیت به صورت IU/μl می باشد. برای تبدیل این استانداردها به IU/ml از رابطه زیر استفاده کنید.

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

نکته: در صورت استفاده ی استخراج یکسان برای تمام نمونه ها می توانید با قرار دادن مقدار استانداردها در فرمول بالا و تعریف آن در دستگاه به صورت یکجا و مستقیم، مقدار IU/mL نمونه ها را به دست آورید. در این صورت، مقدار نمونه های مثبت بالای مقدار LOD را به صورت دقیق مشاهده می کنید.

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 در $Th = 0.02$ قرار دهید، سپس نتایج را به صورت زیر تفسیر کنید:

سیگنال فلورسانس در کانال (A.FAM=green) کاملاً 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=Texas Red) اهمیت ندارد زیرا در صورت بالا بودن غلظت اولیه ژنوم ویروس BK سیگنال در کانال Orange می تواند بسیار ضعیف باشد یا اصلاً وجود نداشته باشد.

۱- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال (A.FAM=Green channel) مشاهده نمی شود. در همین حین سیگنال در کانال (Orange=Texas Red) مربوط به کنترل داخلی قابل مشاهده است.

این حالت نشان دهنده عدم وجود ویروس BK در نمونه پلاسما می باشد. همچنین مثبت بودن سیگنال حاصل از کانال Orange وجود هرگونه مهارکننده واکنش PCR را منتفی می کند.

۲- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال (A.FAM=Green channel) و (Orange=TEXAS Red) قابل مشاهده نیست.

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

رفع مشکل

مشکل	دلیل بروز مشکل	اقدام اصلاحی
1 هیچ سیگنالی دریافت نشده ولی کنترل مثبت سیگنال دارد.	استخراج DNA	استخراج DNA با برخی از کیت‌ها ممکن است همراه با برخی ناخالصی‌هایی باشد که با مسترمیکس واکنش مهاری دهد
2 هیچ سیگنالی از هیچ کانالی دریافت نمی‌شود (حتی در نمونه استاندارد و کنترل داخلی کیت نیز هیچ سیگنالی رویت نشده)	مشکل از مستر میکس می‌باشد	واکنش را مجدد روی کنترل مثبت کیت تکرار کنید تا از مشکل مسترمیکس اطمینان حاصل کنید.
3 رویت سیگنال در نمونه کنترل منفی	مشکل از دستگاه یا نرم‌افزار آن می‌باشد	از نحوه run دستگاه و همچنین سلامت دستگاه اطمینان حاصل کنید.
	آلودگی فضای هود یا work station که میکس اولیه آماده می‌گردد.	با سفیدکننده ۱۰٪ تمام سطوح هود را تمیز کنید و به مدت ۲۰ دقیقه سفید کننده ۱۰٪ بگذارید روی سطوح بماند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه UV را روشن کنید.
	مشکل از سمپلر آلوده یا مشترک می‌باشد	امکان دارد طی روند کار به هر علتی سمپلر هود تمیز شما مقداری آلودگی داشته باشد برای رفع آلودگی بیرون و داخل سمپلر را با وایتکس ۱۰٪ خوب تمیز کنید و سمپلرها را زیر UV به طریقی که سر آنها UV بخورد قرار دهید/ هرگز از سمپلر مشترک که برای نمونه بیمار یا کنترل مثبت استفاده

مشکل	دلیل بروز مشکل	اقدام اصلاحی
		میکنید جهت درست کردن میکس اولیه استفاده نکنید.
	استفاده از یک فضا جهت PCR	توجه داشته باشید که برای انجام تست باید دو فضای مجزا (هود مجزا) برای میکس اولیه و اضافه کردن نمونه بیمار داشته باشید.
4	شدت فلورسنت کم است	برای جلوگیری از این اتفاق دفعه اول به اندازه مورد نیاز هر بار استفاده پرایمر و پروب ها را الکتوت کنید در غیر این صورت اگر طی دو-سه روز کل کیت مصرف می شود پرایمر ها را در دمای ۴ درجه نگهداری کنید.
5	سیگنال فلورسنت حالت سیگموئیدی ضعیفی دارد	در صورت امکان دوباره فرآیند استخراج DNA و یا نمونه گیری را تکرار کنید.
6	گرفتن سیگنالهای خطی (noise)	برای دستگاه Qiaagen (کوربت) گزینه outlier removal را طبق شرایط بهینه نمونه روی ۵٪ یا ۱۰٪ بگذارید.

جدول ۵. راهنمای عیب یابی

ارزیابی آنالیتیکال

اختصاصیت آنالیتیکال

واکنش متقاطع

کیت BK qPCR از لحاظ ایجاد واکنش متقاطع با سایر عوامل بیماری زا ارزیابی شد. هیچ یک از عوامل بیماریزای آزمایش شده واکنش متقاطع نشان ندادند (جدول ۶).

Control group	BK (Cycling Green or Cycling A.FAM)	Internal control (Cycling Orange or Cycling TexasRed)
Cytomegalovirus	—	+
Epstein-Barr virus	—	+
Human herpesvirus 1 (herpes simplex virus 1)	—	+
Human herpesvirus 2 (herpes simplex virus 2)	—	+
Human herpesvirus 3 (varicella-zoster virus)	—	+
Human herpesvirus 6	—	+
JC virus	—	+
Simian virus 40	—	+
<i>HIV</i>	—	+
<i>HBV</i>	—	+
<i>HCV</i>	—	+

جدول ۶. عدم واکنش متقاطع با عوامل بیماری زا

حساسیت آنالیتیکال (پایین ترین حد تشخیص)

محدوده تشخیص آنالیتیکال و همچنین محدوده تشخیص آنالیتیکال با در نظر گرفتن استخراج (محدودیت‌های تشخیصی) برای کیت BK qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت. محدوده تشخیص آنالیتیکال با استفاده از نمونه‌های بالینی مثبت برای BK در کنار یک روش استخراج خاص تعیین میشود. در مقابل، محدوده تشخیص آنالیتیکال بدون استفاده از نمونه بالینی و مستقل از روش استخراج مورد نظر، با استفاده از استانداردهایی با غلظت‌های معلوم تعیین می‌گردد. LOD : این مقدار برای کیت 50 IU/mL به دست آمد.

LOQ: تست حاضر تا 125 IU/mL قابلیت تعیین مقدار با %CV مورد تایید را دارد.

دامنه خطی (linear range)

بر اساس نتایج فوق این مطلب قابل دستیابی است که **linearity** تست در بازه 62 IU/ml الی 5E8 IU/ml با $R^2 = 0.997$ و شیب خط برابر با 0.99 قابل قبول است.

دقت

دقت کیت حاضر $CV\% \leq 10\%$ نتایج قابل قبول را نشان می‌دهد.

حساسیت و اختصاصیت کلینیکال

در قیاس با نتایج مستخرج از کیت Altona BK Virus RG PCR Kit به عنوان روش مرجع، حساسیت تشخیصی و اختصاصیت تشخیصی کلینیکال کیت Senmurv BK qPCR به ترتیب 98% و 100% برای تمامی نمونه‌ها بدست آمد.

ارزیابی پایداری

با توجه به ارزیابی‌های انجام شده جهت بررسی پایداری کیت :

- ✓ تعداد فریز و دفریز کردن قابل قبول کیت مذکور 4 مرتبه می‌باشد.
- ✓ پایداری محتویات کیت حاضر در فریزر تا تاریخ انقضای یک ساله حفظ می‌شود.
- ✓ نتایج تست ریل تایم نشان می‌دهد نتایج کیت تا ۱۲ ماه در زمان واقعی قابل استناد می‌باشد.
- ✓ پس از ۴۸ ساعت دوره انتقال کیت در یخ خشک یا یخ ژله ای همچنان نتایج قابل استناد و موثق هستند.

پشتیبان فنی

جهت ارتباط با پشتیبانی فنی با شماره‌های زیر تماس حاصل فرمایید .

✓ ۰۹۹۳۶۶۹۳۹۴۱ (قره داغی)

✓ ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

نشانه‌ها

	InVitro Diagnostic Medical Device	برای مصرف آزمایشگاهی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temperature Limitation	محدودیت دمایی
	Consult Instruction For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficient for <n> tests	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد، خیابان
حیدر نیا (دوم شرقی)، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی : ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ تلفن تماس : ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Web Site : www.Senmurv.co

Email : info@senmurv.ir