



famtaQUANT BKV Real-Time PCR Kit

کیت تشخیص مولکولی و تعیین میزان BKV به روش Real-Time PCR

راهنمای سریع

Cat Number: 2040104 (24 Reactions)
2040105 (48 Reactions)
2040106 (96 Reactions)



مقدمه

پولیوما ویروس (BK Virus) از خانواده پلیوما ویریده و دارای ژنوم DNA دو رشته ای می باشد. عفونت اولیه با این ویروس عمدتاً در دوران کودکی اتفاق می افتد و فاقد علائم بالینی است. این ویروس پس از عفونت اولیه به صورت مخفی در کلیه ها و سیستم ادراری مستقر می شود. درگیرندگان پیوند خصوصا گیرندگان پیوند کلیه و در بیمارانی که داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی دریافت می کنند، ویروس مجدداً فعال و علائم شدیدی را ایجاد می نماید.

کیت تشخیص BK Virus با روش مولکولی Real-Time PCR به منظور تشخیص کمی DNA ویروس BK در نمونه های پلاسما، سرم، ادرار و سایر مایعات بدن تولید گردیده است.

محتویات کیت

جدول (۱) محتویات کیت

Color	Title	Volume per vial	24 Rxns	48 Rxns	96 Rxns
Blue	PCR Buffer Mix ¹	260 µl	1	2	4
Purple	Primers & Probes ²	130 µl	1	2	4
Red	BKV Standard 1 ³	100 µl	1	1	1
Red	BKV Standard 2 ³	100 µl	1	1	1
Red	BKV Standard 3 ³	100 µl	1	1	1
Red	BKV Standard 4 ³	100 µl	1	1	1
Red	BKV Standard 5 ³	100 µl	1	1	1
Green	Internal Control ⁴	650 µl	1	1	2
White	DDW ⁵	600 µl	1	1	2

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

شرایط نگهداری

- کیت را تا زمان انقضا در فریز 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 تاثیر 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 BKV Real-Time PCR، یک کیت تشخیصی آزمایشگاهی مبتنی بر متد TaqMan بوده، که به منظور تشخیص و تعیین میزان DNA اختصاصی BKV تولید گردیده است. تست دارای یک سیستم تکثیر هترولوگ (تکثیر ژن کنترل داخلی) جهت تعیین احتمال وجود ممانعت کننده های PCR و همچنین صحت عملکرد محلول های کیت می باشد.

پروپ اختصاصی FAM BKV DNA با رنگ FAM (کانال سبز) و پروپ اختصاصی ژن کنترل داخلی (IC) با رنگ JOE (کانال زرد) نشان دار شده است.

استفاده از پروپ های متصل شده به رنگ های متفاوت، امکان تشخیص همزمان DNA اختصاصی BKV و کنترل داخلی را به دستگاه Real-Time PCR می دهد.

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 التراتیو JOE، HEX یا VIC می باشند.

نمونه و شرایط نگهداری آن

- نمونه های مناسب جهت انجام آزمون کمی BKV، پلاسما و ادرار بیمار است.
- نمونه خون بیمار باید در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شده و پلاسمای جدا شده تا زمان استخراج در فریزر ۲۴- درجه سانتیگراد نگهداری شود.
- نمونه ادرار باید در ظرف استریل مخصوص کشت ادرار گرفته شده سپس در داخل لوله های فالتون استریل ریخته و به مدت ۵ دقیقه در دور 4000 rpm سانترفیوژ گردد. پس از اتمام سانترفیوژ، از سطح نمونه 200 µL برداشته شود و تا زمان استخراج، در فریزر ۲۴- درجه سانتی گراد نگهداری شود.
- پیشنهاد می شود قبل از فریز کردن، نمونه ی پلاسما/ سرم 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 پلاسما حاوی هیپارین 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 ی وایتکس ۱۰٪ و سپس الکل ۷۰٪ ضد عفونی 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

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

کیت های استخراج QIAamp DNA Blood mini Kit یا QIAamp DSP Virus Spin Kit (کمپانی کیاژن) جهت استخراج BKV DNA توصیه می گردند.

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 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.
 - DNA استخراج شده را می توان تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.
- توجه:** اگر حجم نمونه و یا Elution Buffer نهایی را تغییر دادید حتماً با کارشناسان فنی شرکت تماس بگیرید.

آماده سازی واکنش

تهیه مستر میکس

بر اساس تعداد واکنش هایی که میخواهید انجام دهید ویال های کیت شامل PCR Buffer 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.

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 ۲ تهیه نمایید.

جدول (۲) آماده سازی میکس PCR به همراه کنترل داخلی

Number of Reactions (rxns)	1
PCR Buffer Mix	10 µL
Primers & Probes	5 µL
Internal Control	2 µL
Master Mix Volume	17 µL

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 پلاسما 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	10 µL
Primers & Probes	5 µL
Master Mix Volume	15 µL

اضافه کردن الگو

- مستر میکس آماده شده را به کمک پیتپینگ و یا ورتکس آرام، هموزن و سپس اسپین نمایید.
- مقدار 15 µL 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 µL از DNA استخراج شده (برای بیماران)، همچنین از هریک از استاندارد ها را در میکروتیوب های مربوطه اضافه نموده و حداقل ۲ بار و به آرامی پیتپینگ 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.BKV (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
Initial denaturation and polymerase activation	95°C	15 min	-----	1X
Denaturation	95°C	15 sec	-----	45X
Annealing and elongation	60°C	40 sec	yes	

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.

جدول (۵) غلظت ویال های استاندارد

Quantification Standards	Column 1 Concentration [copies/µl]	Column 2 Concentration [copies/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 BKV بوده ولی دارای منحنی تکثیر برای کنترل داخلی باشد این نمونه منفی در نظر گرفته می شود.
- اختلاف قابل توجه Ct کنترل داخلی یک نمونه نسبت به سایر نمونه ها و بالا نرفتن نمودار کنترل داخلی برای نمونه ای که لود ویروسی پایینی دارد را می توان ناشی از لود ویروسی نامناسب آن نمونه دانست. در این صورت تکرار استخراج آن نمونه 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 ی نمودارهای سیگموتیدی، گزینه ی Slope correction را روشن و یا خاموش نمایید.

جدول (۶) تفسیر نتایج یک آزمون

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

یادداشت:

* برای دسترسی به دفترچه ی 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 ی طباطبایی، پلاک ۲

ایمیل پشتیبانی: support@famta.co

تلفن پشتیبانی: ۰۹۰۴ ۴۳۷ ۹۰۰۰

CCTCGAGGACAAGGCGTT
AGTCCAGATGACCA
TACCFAMTAAG
TTGAAAGA
TAGG