

فعال سازی مجدد BK در بیماران پیوند کلیه و مغز استخوان شایع تر است و منجر به سیستمیت هموراژیک (HC) و نفروپاتی مرتبط با پلیوماوایروس (PVAN) می شود.

کیت BehDx BK Real Time PCR به منظور شناسایی حضور ژنوم ویروس BK با استفاده از روش TaqMan Real Time PCR در نمونه های پلاسما، ادرار و مایع مغزی - نخاعی (CSF) طراحی و عرضه شده است.

4. حیطه کاربری

کیت BehDx BK Real Time PCR یک تست آزمایشگاهی با کاربرد تحقیقاتی است که بر مبنای روش Real-Time PCR و همچنین استفاده از تکنیک TaqMan طراحی شده است. کیت حاضر با استفاده از روش اشاره شده، قادر به بررسی و تشخیص ویروس BK به صورت کیفی می باشد.

5. نکات مهم: لطفاً قبل از استفاده مطالعه شود.

- قبل از شروع فرآیند تمامی ریجنت ها بایستی در دمای محیط قرار گیرند تا ذوب شوند.
- زمان ذوب شدن ریجنت ها بیش از 30 دقیقه نباشد تا از تخریب مواد جلوگیری شود.
- پس از ذوب ریجنت ها، همگن و میکروفیوژ شوند.
- کلیه مراحل بایستی بر روی بلوک سرد انجام گیرد.
- از میکروتیوب های DNase & RNase free و تیپ های فیلتردار DNase & RNase free استفاده شود.

6. تجهیزات و مواد لازم که در کیت فراهم نشده است

- دستگاه های Real-Time PCR سازگار (به بخش 8 دستگاه های سازگار مراجعه شود)
- کیت ها و یا دستگاه های استخراج DNA مناسب (به بخش 10-1 استخراج DNA مراجعه شود)
- دستگاه سانتریفیوژ و میکرواسپین
- میکروتیوب PCR و تیپ های فیلتر دار DNase & RNase free
- دستکش بدون پودر یک بار مصرف

7. نمونه های قابل استفاده

- پلاسما جمع آوری شده در تیوب های حاوی EDTA و یا سیترات ادرار
- مایع مغزی - نخاعی (CSF)
- نمونه ها تا قبل از استخراج DNA بایستی در دمای 2-8 درجه سانتی گراد نگه داری گردد و در صورتی که شرایط استخراج و یا انتقال

1. محتویات کیت

CAT.NO	محتویات	BK (24RXN)	BK (48RXN)	BK (96RXN)	رنگ درب تیوب
BD418	BK Mix 1	1x300 µl	2x300 µl	4x300 µl	آبی
BD419	BK Mix 2	1x60 µl	2x60 µl	4x60 µl	قهوه ای
BD420	BK Internal Control	1x200 µl	1x400 µl	2x400 µl	سفید
BD421	BK Positive Control	1x80 µl	1x160 µl	2x160 µl	قرمز
BD422	BK Negative Control	1x80 µl	1x160 µl	1x320 µl	سبز

2. شرایط پایداری و نگهداری

- حمل کیت بایستی در شرایط دمای -20°C و در حداقل زمان ممکن صورت گیرد.
- پس از دریافت کیت، محتویات بایستی مطابق شرایط درج شده بر روی جعبه کیت نگه داری شوند.
- در صورت نگه داری کیت در دمای نامناسب در حین حمل از آن استفاده نشود.
- در صورت سالم نبودن بسته بندی کیت و یا عدم تطابق شکل ظاهری مواد مصرفی با توضیحات از آن استفاده نشود.
- کیت را در دمای ثابت نگه داری نموده و از نور خورشید محافظت کنید.
- از تکرار متعدد چرخه انجماد / ذوب بپرهیزید.
- در صورت باز نشدن مواد مصرفی و نگه داری در دمای توصیه شده این محصول تا پایان تاریخ انقضای مندرج بر روی جعبه کیت پایدار خواهد ماند.

3. معرفی

خانواده Polyomaviridae شامل حداقل 16 عضو است که گونه های مختلف پستانداران را آلوده می کنند. یک مورد از آن ها، پلیوماوایروس BK (BK) می باشد که عفونت های همه جانبه را در انسان ایجاد می کنند. عفونت اولیه عمدتاً در دوران کودکی رخ می دهد و معمولاً بدون علامت است. سلول های اپیتلیال کلیه، حالب و مثانه به عنوان انواع سلول های غالب که به طور مداوم توسط BK آلوده می شوند، شناسایی شدند. در حالی که عفونت های پلیوماوایروس در افراد دارای ایمنی مناسب، ناآشکار باقی می ماند، فعال شدن مجدد BK به دلیل سرکوب سیستم ایمنی ممکن است منجر به بیماری های جدی شود.

نمونه در طی 24 ساعت اولیه فراهم نبود، نگه داری نمونه ها در دمای 20- تا 80- درجه سانتی گراد صورت گیرد.

توجه: استفاده از هپارین به عنوان ضد انعقاد در فرایند PCR اختلال ایجاد می کند، به همین دلیل از لوله های حاوی هپارین استفاده نشود. همچنین نمونه بیمارانی که هپارین مصرف می کنند برای PCR مناسب نیست.

8. دستگاه های سازگار

کیت برای استفاده در دستگاه های PCR زیر توسعه و اعتبارسنجی شد.

- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- Mic qPCR cyclers (Bio Molecular Systems)
- Tianlong Real-Time PCR systems (Xi'an Tianlong Science and Technology)
- QuantStudio™ 5 Pro Real-Time PCR System
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

توجه: این کیت برای استفاده در دستگاه های بدون نیاز به ROX طراحی گردیده است..

9. نکات ایمنی: قبل از استفاده با دقت مطالعه شود

- از جابه جایی و یا ترکیب ريجنت های کیت با Lot Number مختلف جدا خودداری کنید.
- برای جلوگیری از انتقال آلودگی به محلول مسترمیکس، بلافاصله پس از دریافت کیت، تیوب های کنترل مثبت، منفی و تیوب کنترل داخلی را در فریزر مجزا از تیوب های مستر میکس قرار دهید.
- از کیت و یا اجزای کیت بعد از گذشت تاریخ انقضا استفاده نشود.
- این محصول توسط افراد متخصص و آموزش دیده در زمینه تست های مولکولی قابل استفاده می باشد، هنگام کار از گان آزمایشگاهی و دستکش یکبار مصرف استفاده کنید.
- در هنگام استفاده از ريجنت های کیت توصیه می شود از دستکش های بدون پودر استفاده شود.
- تمامی نمونه ها می توانند باعث انتقال آلودگی شوند و بایستی در حمل و استفاده از آن ها دقت شود. از تماس مستقیم با نمونه ها خودداری شود. لوازم و موادی که با نمونه ها در ارتباط بوده بایستی به درستی ضد عفونی و اتوکلاو شوند.

- از تماس نمونه یا ريجنت ها با پوست، چشم و غشاهای مخاطی خودداری کنید. در صورت تماس با پوست، چشم یا غشاهای مخاطی، فوراً با آب بشویید و سریعاً به پزشک مراجعه کنید.
- تمامی محتویات کیت پس از استفاده جزو دسته ی زباله های زیستی خطرناک می باشد و باید به درستی دفع شود.

10. فرآیند (دستورالعمل استفاده)

1-10. استخراج DNA

برای جداسازی DNA استفاده از کیت های زیر توصیه می شود:

1. BehPrep G-Plus DNA Extraction Kit (Cat Number: BP101)
 2. BehPrep Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Cat Number: BPVD050)
- استخراج DNA توسط کیت و دستگاه های استخراج با کیفیت و خلوص کافی نیز مورد تایید است.
- استخراج دستگاهی زیر نیز توصیه می شود:
3. BehMag Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Cat Number: BM202)

2-10. کنترل داخلی

کیت BehDx BK Real Time PCR شامل یک ویال کنترل داخلی (IC) است که به منظور کنترل احتمال وجود مهارکننده های PCR و نظارت بر روش جداسازی DNA مورد استفاده قرار می گیرد.

اگر می خواهید از کنترل داخلی منحصرراً برای بررسی مهار PCR استفاده کنید، باید مستقیماً به Master Mix اضافه شود. در صورتی که از کنترل داخلی برای نظارت بر روش جداسازی DNA و بررسی احتمال مهار PCR استفاده شود، بایستی در مرحله استخراج، کنترل داخلی را به میزان 10 درصد از حجم بافر الوشن در مرحله لایز اضافه کنید، به عنوان مثال اگر حجم مورد استفاده بافر الوشن در مرحله استخراج 60 µl باشد، به مقدار 6 µl از IC برای هر نمونه به میکس بافر لایز کننده و نمونه اضافه شود.

توجه: کنترل داخلی را مستقیماً به نمونه اضافه نکنید. کنترل داخلی باید فقط به مخلوط بافر لایز کننده و نمونه یا مستقیماً به بافر لایز کننده اضافه شود.

3-10. آماده سازی مسترمیکس

1. برای تهیه مستر میکس، 12.5 µl از BK Mix 1 و 2.5 µl از BK Mix 2 برای هر نمونه به لوله اصلی واکنش اضافه نمایید.
- در صورتی که کنترل داخلی در مرحله استخراج اضافه شده باشد، لطفاً مطابق برنامه حجمی مندرج در جدول زیر تیوب ها را آماده کنید.

* خوانش در دمای 60 °C انجام می‌گیرد و کانال‌های FAM و HEX بایستی روشن شوند.

سیگنال FAM (سبز) نشان دهنده وضعیت ژن BK و سیگنال HEX (زرد) نشان دهنده وضعیت ژن کنترل داخلی می‌باشد.

11. تفسیر نتایج

1. نمودارهای مثبت بایستی به صورت کاملاً سیگموئیدی باشند و نمودارهایی که شکل سیگموئیدی ندارند می‌بایستی به عنوان منفی در نظر گرفته شوند.
 2. خط آستانه (threshold) بر اساس نمونه مثبت و یا کنترل مثبت تعیین شود.
- نتایج به دست آمده بر اساس جدول زیر تفسیر شود.

کانال		تفسیر
FAM	HEX	
+	+/-	• ویروس BK شناسایی شده است. • در صورتی که در کانال HEX منحنی برای نمونه مشاهده نشود ولی در کانال FAM منحنی مشاهده شود نمونه مثبت در نظر گرفته می‌شود.
-	+	• ویروس BK شناسایی نشده است. • نمونه شامل مقدار قابل شناسایی از DNA ویروسی نمی‌باشد.
-	-	• وجود مهارکننده در واکنش PCR • انجام ناصحیح مراحل فرآیند تست و آماده سازی واکنش، تست از مرحله استخراج یا PCR تکرار شود..

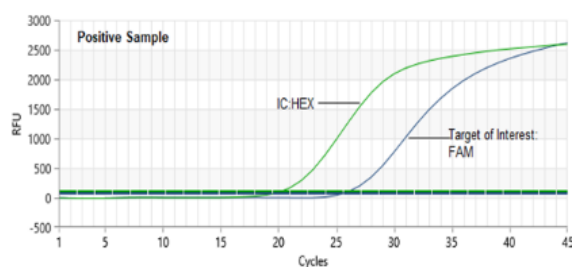


Figure1. -Positive Sample

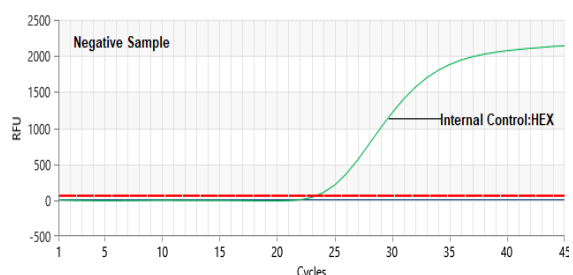


Figure2-Negative Sample

Number of Reactions	1	15
BK Mix 1	12.5 µl	187.5 µl
BK Mix 2	2.5 µl	37.5 µl
Total	15 µl	225 µl

- در صورتی که کنترل داخلی در مرحله PCR اضافه شود، بایستی مطابق جدول زیر کنترل داخلی مستقیماً به Master Mix اضافه شود.

Number of Reactions	1	15
BK Mix 1	12.5 µl	187.5 µl
BK Mix 2	2.5 µl	37.5 µl
BK Internal Control	1 µl	15 µl
Total	16 µl	240 µl

2. میکروتیوب را ابتدا ورتکس و سپس برای مدت کوتاهی میکروپیوژ نمایید.

4-10. آماده سازی واکنش PCR

1. 15 µl از مسترمیکس تهیه شده در مرحله قبل به تیوب های PCR اضافه گردد.
2. به هر تیوب تست بیمار 10 µl از DNA استخراج شده یا 10 µl از کنترل ها (کنترل مثبت و یا منفی) اضافه گردد.
3. میکس نمونه و مسترمیکس، و همچنین کنترل و مستر میکس کاملاً همگن و میکروپیوژ گردد.

پیشنهاد می‌شود تمام این مراحل بر روی یخ یا بلوک سرد انجام شود.

Reaction setup	
Master Mix	15 µl
Sample or Control	10 µl
Total	25 µl

5-10. برنامه دمایی

تیوب ها را در دستگاه قرار داده و مطابق برنامه زیر تست را انجام دهید.

program	Temperature [°C]	Hold [hh:mm:ss]	Cycles	Analysis Mode
Activation	95	00:03:00	1	None
Amplification	95	00:00:10	45	Quantification
	60*	00:00:30		

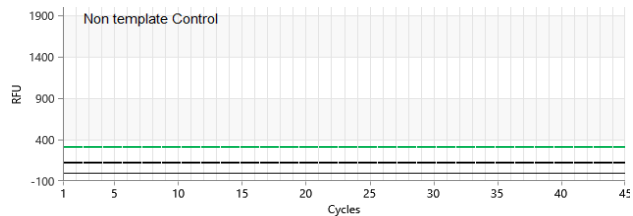


Figure3.Non-Template Control

12. حساسیت تحلیلی:

حساسیت تحلیلی کیت حاضر با تجزیه و تحلیل سری رقت پلاسمید BK تعیین شده است. حساسیت تحلیلی برای تشخیص DNA اختصاصی ویروس BK، برابر با $0.5 \text{ IU}/\mu\text{L}$ می باشد.

13. اختصاصیت تحلیلی:

اختصاصیت تحلیلی پرایمرها و پروب های کیت BehDx BK Real Time PCR ابتدا با استفاده از مطالعات دقیق بیوانفورماتیکی بررسی شدند تا اطمینان حاصل شود که توانایی شناسایی همه ژنوتیپ های BK مربوطه را دارا می باشند. علاوه بر این اختصاصیت تحلیلی پرایمرها و پروب ها با نمونه های منفی نیز تایید شد. نمونه های منفی هیچ سیگنالی با پرایمرها و پروب BK ایجاد نمی کنند.

همچنین هنگام آزمایش نمونه های DNA و RNA میکروارگانیسم های مختلف که امکان یافت شدن آن ها در خون وجود دارد، هیچ واکنش متقابلی با این پاتوژن ها مشاهده نشد. این پاتوژن ها شامل:

- Cytomegalovirus (CMV)
- Epstein-Barr virus (EBV)
- Hepatitis C virus (HCV)
- Hepatitis B virus (HBV)
- Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
- Herpes simplex virus 2 (HSV-2)
- Varicella-zoster virus
- JC virus

مفهوم	نماد	مفهوم	نماد
محدودیت دهایی	15- 25-	کاربرد تحقیقاتی	RUO
تعداد تست	Σ	اطلاعات کارخانه	
تاریخ انقضا		تاریخ تولید	
مخاطرات زیستی		از تابش نور دور نگه داشته شود	
حاوی دستور العمل استفاده از محصول		احتیاط	
کد کالا	REF	شماره سری ساخت	LOT