

شوند، شناسایی شدند. در حالی که عفونت های پلیوماویروس 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. فعال سازی مجدد BK در بیماران پیوند کلیه و مغز استخوان شایع تر است و به ترتیب منجر به سیستمیت هموراژیک (HC) و نفروپاتی مرتبط با پلیوماویروس (PVAN) می شود.

کیت BehDx BK quantitative Real Time PCR به منظور شناسایی حضور ژنوم ویروس BK و تعیین میزان کمی این ویروس 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 quantitative 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 شناسایی ویروس BK به صورت کیفی و تعیین میزان کمی این ویروس می باشد.

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

- قبل از شروع فرایند 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 ویروسی مناسب (به بخش 10-11 استخراج DNA ویروسی مراجعه شود)
- دستگاه سانتریفیوژ و میکروواسپین
- 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)
- نگه داری نمونه ها تا قبل از استخراج DNA بایستی در دمای 2-8 درجه سانتی گراد و نهایتاً به مدت 24 ساعت و در صورتی که شرایط

1. محتویات کیت

CAT.NO	محتویات	BK (24RXN)	BK (48RXN)	BK (96RXN)	رنگ درب تیوب
BD418	BK Mix 1	1×300 µl	2×300 µl	4×300 µl	آبی
BD419	BK Mix 2	1×60 µl	2×60 µl	4×60 µl	قهوه ای
BD420	BK Internal Control	1×200 µl	1×400 µl	2×400 µl	سفید
BD423	BK QS1 (1×10 ⁴ IU / µl)	1×50 µl	2×50 µl	4×50 µl	قرمز
BD424	BK QS2 (1×10 ³ IU / µl)	1×50 µl	2×50 µl	4×50 µl	قرمز
BD425	BK QS3 (1×10 ² IU / µl)	1×50 µl	2×50 µl	4×50 µl	قرمز
BD426	BK QS4 (1×10 ¹ IU / µl)	1×50 µl	2×50 µl	4×50 µl	قرمز
BD422	BK Negative Control	1×80 µl	1×160 µl	1×320 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 از حداقل 16 عضو تشکیل شده است که گونه های مختلف پستانداران را آلوده می کنند. یک مورد از آن ها، پلیوماویروس 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

- تمامی محتویات کیت پس از استفاده جزء دسته ی زباله های زیستی خطرناک می باشد و باید به درستی دفع شود.

10. فرآیند (دستورالعمل استفاده)

10-1. استخراج DNA

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

1. BehPrep Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Cat Number: BPVD050)
2. BehPrep G-Plus DNA Extraction Kit (Cat Number: BP101)
3. Behmag Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Cat Number: BM202)

استخراج DNA توسط کیت و دستگاه های استخراج با کیفیت و خلوص کافی نیز مورد تایید است.

10-2. کنترل داخلی

کیت BehDx BK quantitative 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 منحصراً 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.

10-3. آماده سازی مسترمیکس

1. برای تهیه مستر میکس، 12.5 µl از BK Mix 1 و 2.5 µl از BK Mix 2 و 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.

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

استخراج و یا انتقال 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

- از جا به جایی و یا ترکیب ریجنت 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 حاوی مسترمیکس 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 ریجنت 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 ضدعفونی و اتوکلاو شوند.
- از تماس نمونه یا ریجنت 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.

- 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

11. تفسیر نتایج

1. نمودارهای مثبت بایستی به صورت کاملاً سیگموئیدی باشند و نمودارهایی که شکل سیگموئیدی ندارند می بایستی 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 می شود.
-	+	• ویروس BK شناسایی نشده است. • نمونه شامل مقدار قابل شناسایی از DNA ویروسی نمی باشد.
-	-	• وجود مهارکننده در واکنش PCR • انجام ناصحیح مراحل فرایند تست و آماده سازی واکنش، تست از مرحله استخراج یا PCR تکرار شود.

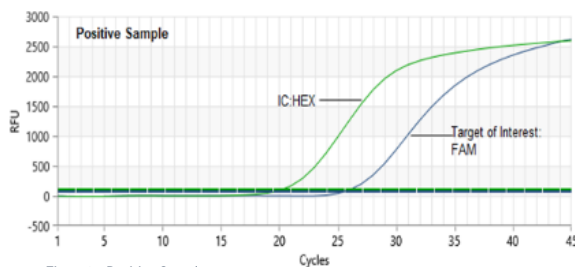


Figure1. -Positive Sample

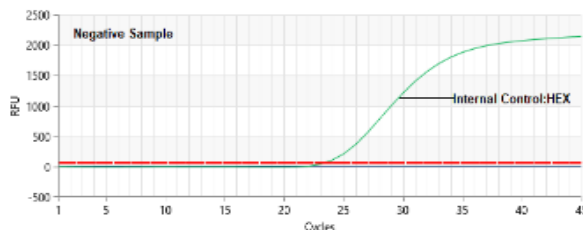


Figure2. -Negative Sample

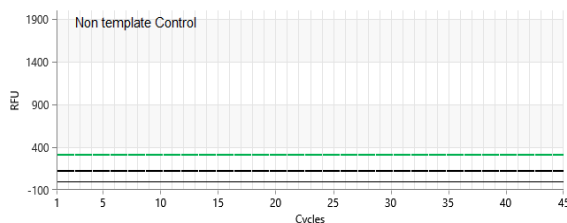


Figure3. Non-Template Control

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

10-4. آماده سازی واکنش PCR

1. 15 µl از مسترمیکس تهیه شده در مرحله قبل را به تیوب های PCR اضافه گردد.
 2. به هر تیوب تست 10 µl از DNA استخراج شده بیمار یا 10 µl از کنترل ها (کنترل مثبت یا منفی) اضافه گردد.
 3. به 4 تیوب از واکنش 10 µl از استاندارد های شماره 1 تا 4 به ترتیب اضافه گردد.
 4. میکس نمونه و مسترمیکس ، و همچنین کنترل و مسترمیکس کاملاً همگن و میکروفیوژ گردد.
- پیشنهاد می شود تمام این مراحل بر روی یخ یا بلوک سرد انجام شود.

Reaction setup	
Master Mix	15 µl
Sample or Control (QS1-4 or Negative Control)	10 µl
Total	25 µl

10-5. 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		

- * خوانش در دمای 60 ° C انجام می گیرد و کانال های FAM و HEX بایستی روشن شوند .

سیگنال FAM (سبز) نشان دهنده وضعیت ژن BK و سیگنال HEX (زرد) نشان دهنده وضعیت ژن کنترل داخلی می باشد

12. نتایج کمی:

کیت حاضر شامل چهار استاندارد کمی (QS) است که به منظور ایجاد یک منحنی استاندارد با غلظت های مناسب تعریف شوند. با استفاده از این منحنی استاندارد نمونه های مثبت با غلظت های ناشناخته را می توان کمی سازی کرد.

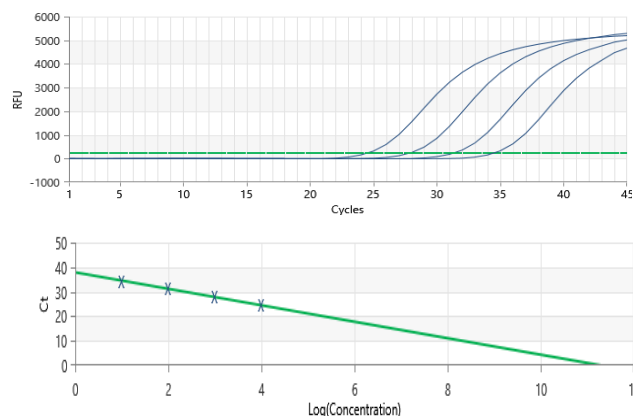


Figure 4. Standard Curve

غلظت "نمونه" بر حسب IU/μl نمایش داده می شود و به غلظت DNA ویروسی استخراج شده اشاره دارد. برای تعیین بار ویروسی نمونه بیمار بر حسب IU/ml، فرمول زیر باید اعمال شود:

$$\text{Viral load (Sample)} \left[\frac{\text{IU}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Volume (Eluate)} [\mu\text{l}] \times \text{Viral load (Eluate)} \left[\frac{\text{IU}}{\mu\text{l}} \right]}{\text{Sample Input} [\text{ml}]}$$

13. حساسیت تحلیلی:

حساسیت تحلیلی کیت حاضر با تجزیه و تحلیل سری رقت پلاسמיד BK تعیین شده است. حساسیت تحلیلی برای تشخیص DNA اختصاصی ویروس BK، برابر با IU/μl 0.5 می باشد.

14. اختصاصیت تحلیلی:

اختصاصیت تحلیلی پرایمرها و پروب های کیت BehDx BK quantitative 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

نماد	مفهوم	نماد	مفهوم
	کاربرد تحقیقاتی		محدودیت دمایی
	اطلاعات کارخانه		تعداد تست
	تاریخ تولید		تاریخ انقضا
	از تاریخ تور دور نگه داشته شود		مخاطرات زیستی
	احتیاط		جای دستور العمل استفاده از محصول
	شماره سری ساخت		کد IU