

معده مرتبط است. EBV علاوه بر ارتباط با انواع مختلف سرطان انسان، با بیماری های غیر بدخیم از جمله مونونوکلئوز عفونی (Infectious mononucleosis)، لکوپلاکی مودار دهان (oral leukoplakia)، لوپوس اریتماتوز سیستم (Systemic Lupus Erythematosus) و مولتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis) نیز مرتبط است.

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

4. حیطه کاربری

کیت BehDx EBV 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 EBV به صورت کیفی می باشد.

5. نکات مهم: لطفا 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 مراجعه شود)
- دستگاه سانتیفریوژ و میکروواسپین
- میکروتیوب PCR و تیپ های فیلتردار DNase & RNase free
- دستکش بدون پودر یک بار مصرف

7. نمونه های قابل استفاده

- خون کامل
- پلاسما جمع آوری شده در تیوب های حاوی EDTA و یا سیترات
- مایع مغزی-نخاعی (CSF)

1. محتویات کیت

CAT.NO	محتویات	EBV (24RXN)	EBV (48RXN)	EBV (96RXN)	رنگ درب تیوب
BD427	EBV Mix 1	1×300 µl	2×300 µl	4×300 µl	آبی
BD428	EBV Mix 2	1×60 µl	2×60 µl	4×60 µl	قهوه ای
BD429	EBV Internal Control	1×200 µl	1×400 µl	2×400 µl	سفید
BD430	EBV Positive Control	1×80 µl	1×160 µl	2×160 µl	قرمز
BD431	EBV 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

ویروس اپشتین بار (Epstein-Barr virus (EBV که به عنوان ویروس هرپس انسانی 4 (HHV-4) نیز شناخته می شود، عضوی از خانواده گاما هرپس ویروس ها است. EBV اولین بار در سال 1964 در لنفوم بورکیت (Burkitt's lymphoma) کشف شد و بعدها مشخص شد که با انواع دیگر لنفوم از جمله لنفوم هوچکین (Hodgkin's lymphoma)، لنفوم غیر هوچکین در بیماران پس از پیوند و افراد آلوده به HIV، لنفوم سلول T و لنفوم سلول NK/T مرتبط است. EBV همچنین با سرطان های اپیتلیال از جمله کارسینوم نازوفارنکس (Nasopharyngeal carcinoma) و زیر مجموعه ای از سرطان های

- نمونه‌ها تا قبل از استخراج DNA بایستی در دمای 2-8 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردد و در صورتی که شرایط استخراج و یا انتقال نمونه در طی 24 ساعت اولیه فراهم نبود، نگهداری نمونه‌ها در دمای 20- تا 80- درجه سانتی‌گراد صورت گیرد.

توجه: استفاده از هیپارین به عنوان ضدانعقاد در فرایند PCR اختلال ایجاد می‌کند، به همین دلیل از لوله‌های حاوی هیپارین استفاده نشود. همچنین نمونه بیمارانی که هیپارین مصرف می‌کنند برای PCR مناسب نیست.

8. دستگاه های سازگار

کیت برای استفاده در دستگاه‌های 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 دستگاه‌های بدون نیاز به ROX طراحی گردیده است.

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

- از جابه‌جایی و یا ترکیب ريجنت‌های کیت با Lot Number مختلف جدا خودداری کنید.
- برای جلوگیری از انتقال آلودگی به محلول مسترمیکس، بلافاصله پس از دریافت کیت، تیوب‌های 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 آموزش‌دیده در زمینه تست‌های مولکولی قابل استفاده می‌باشد، هنگام کار از گان آزمایشگاهی و دستکش یکبار مصرف استفاده کنید.
- در هنگام استفاده از ريجنت‌های کیت توصیه می‌شود از دستکش‌های بدون پودر استفاده شود.
- تمامی نمونه‌ها می‌توانند باعث انتقال آلودگی شوند و بایستی در حمل و استفاده از آن‌ها دقت شود. از تماس مستقیم با نمونه‌ها خودداری شود. لوازم و موادی که با نمونه‌ها در ارتباط بوده بایستی به‌درستی ضدعفونی و اتوکلاو شوند.

- از تماس نمونه یا ريجنت‌ها 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 زباله‌های زیستی خطرناک می‌باشد و باید به‌درستی دفع شود.

10. فرآیند (دستورالعمل استفاده)

1-10. استخراج DNA

برای جداسازی DNA استفاده از کیت‌های زیر توصیه می‌شود:

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 دستگاه‌های استخراج باکیفیت و خلوص کافی نیز مورد تأیید است.

استخراج دستگاهی زیر نیز توصیه می‌شود:

3. BehMag Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Cat Number: BM202).

2-10. کنترل داخلی

کیت BehDx EBV Real Time PCR شامل یک ویال کنترل داخلی (IC) است که به‌منظور کنترل احتمال وجود مهارکننده‌های PCR و نظارت بر روش جداسازی DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد.

اگر می‌خواهید 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 مسترمیکس، 12.5 µl از EBV Mix 1 و 2.5 µl از EBV 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 تیوب‌ها را آماده کنید.

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

سیگنال FAM (سبز) نشان‌دهنده وضعیت ژن EBV و سیگنال HEX (زرد) نشان‌دهنده 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 EBV 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 EBV شناسایی نشده است. • نمونه شامل مقدار قابل شناسایی از DNA ویروسی نمی‌باشد.
-	-	• وجود مهارکننده در واکنش PCR • انجام ناصحیح مراحل فرایند تست و آماده سازی واکنش، تست از مرحله استخراج یا PCR تکرار شود.

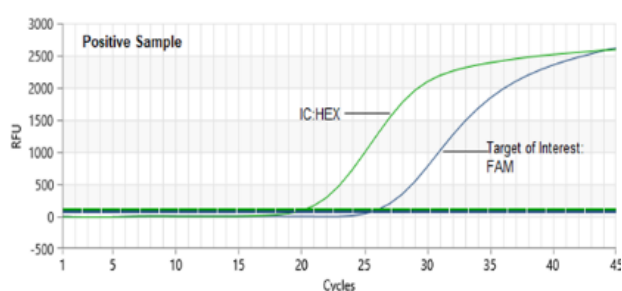


Figure1. -Positive Sample

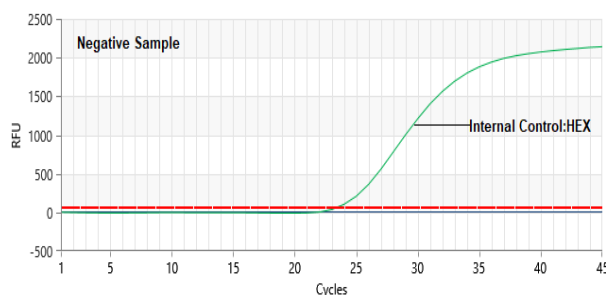


Figure2-Negative Sample

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

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

4-10. آماده سازی واکنش PCR

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

تیوب‌ها 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		

نماد	مفهوم	نماد	مفهوم
	کاربرد تحقیقاتی		محدودیت دمایی
	اطلاعات کارخانه		تعداد تست
	تاریخ تولید		تاریخ انقضا
	از تابش نور دور نگه داشته شود		مخاطرات زیستی
	احتیاط		جای دستورالعمل استفاده از محصول
	شماره سری ساخت		کد کالا

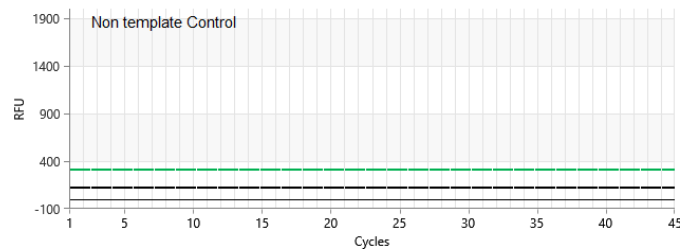


Figure3.Non-Template Control

12. حساسیت تحلیلی:

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

13. اختصاصیت تحلیلی:

اختصاصیت تحلیلی پرایمرها و پروب های کیت BehDx EBV Real Time PCR ابتدا با استفاده از مطالعات دقیق بیوانفورماتیکی بررسی شدند تا اطمینان حاصل شود که توانایی شناسایی همه ژنوتیپ های EBV 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 EBV 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)
- 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
- BK virus