

راهنمای کاربری

کیت شناسایی و سنجش کمی

ویروس هپاتیت ب در پلاسما به روش Real-Time PCR

DynaBio™ HBV Quantitative Real-Time PCR Detection Kit

ویرایش ۱/۵
اردیبهشت ماه ۱۴۰۱

۵۰ آزمون

شناسه: ک ر ۰۰۱۵

Cat # KR0015

تکاپوزیت



فهرست:

	اطلاعات کلی
۳	محتویات
۳	نگهداری
۴	اطلاعات ایمنی
۴	کنترل کیفیت
۴	نشانه ها
۵	معرفی کیت حاضر
۵	محدودیت های بکارگیری محصول
۶	مختصری درباره Real-Time PCR
۸	ویروس هپاتیت ب و بیماری زایی
۸	رابطه تعداد نسخ ویروس و واحد بین المللی
	ویژگی های عملکردی
۹	حساسیت تحلیلی
۹	ویژگی تحلیلی
۱۱	بازه خطی
۱۱	دقت
۱۴	ارزیابی تشخیصی
۱۶	سایر مواد و وسایل مورد نیاز (که در کیت ارائه نشده)
۱۶	توصیه های عمومی
۱۷	جمع آوری، نگهداری و حمل و نقل نمونه ها
۱۷	نگهداری نمونه
۱۸	حمل و نقل نمونه
۱۸	مواد تداخل کننده





۱۹

معرفی اجزای کیت

روش کار

۲۱

استخراج دنا (DNA)

انجام آزمون Real-time PCR

۲۲

نکات عمومی

۲۳

آماده سازی مخلوط اصلی واکنش

۲۴

برنامه واکنش PCR

۲۴

نکته

۲۸

تحلیل داده ها

۲۹

معنای نتایج

۳۰

روندنمای تفسیر نتایج و گزارش نهایی

۳۱

تعیین تیترو ویروس بر حسب IU در هر میلی لیتر پلاسما

۳۱

حل مشکل

۳۳

مراجع / استانداردهای مورد استفاده

۳۴

پشتیبانی فنی

۳۴

نشانی





اطلاعات محتویات

ردیف	عناوین و محتویات	تعداد ویال در هر کیت ۵۰ تایی	حجم در هر ویال (میکرولیتر)
۱	مخلوط ۱ Mix1	۱	۶۲۵
۲	مخلوط ۲ Mix2	۱	۱۵۰
۳	استاندارد ۱ $1 \times 10^5 \text{ IU}/\mu\text{l}$	۱	۲۰۰
۴	استاندارد ۲ $1 \times 10^4 \text{ IU}/\mu\text{l}$	۱	۲۰۰
۵	استاندارد ۳ $1 \times 10^3 \text{ IU}/\mu\text{l}$	۱	۲۰۰
۶	استاندارد ۴ $1 \times 10^2 \text{ IU}/\mu\text{l}$	۱	۲۰۰
۷	استاندارد ۵ $1 \times 10^1 \text{ IU}/\mu\text{l}$	۱	۲۰۰
۸	کنترل داخلی IPC	۱	۵۰۰
۹	کنترل منفی NTC	۱	۱۲۵۰

نگهداری

کیت می‌بایست در دمای 20°C - نگهداری شود. برای اطلاع از شماره سری ساخت^۱ و تاریخ انقضای کیت به برچسب روی جعبه کیت رجوع شود. برای جلوگیری از کاهش حساسیت آزمون، از ذوب و انجماد^۲ مکرر مواد (بیش از ۵ بار) خودداری گردد.

^۱ Lot#

^۲ Freeze & thawing





اطلاعات ایمنی

برای آگاهی از اطلاعات ایمنی کیت، لطفاً برگه داده های ایمنی^۱ مربوط را در وب سایت شرکت بیابید.

کنترل کیفیت

هر سری ساخت "کیت شناسایی و سنجش کمتی ویروس هیپاتیت ب در پلاسما" به منظور اطمینان از ثابت بودن و یکنواختی کیفیت محصول در مورد یک سری ویژگی های از پیش تعیین شده مورد آزمایش واقع می شود.

نشانه ها

تاریخ انقضا		تعداد آزمون	
تاریخ تولید		شرایط دمایی نگهداری	
شرکت سازنده		شناسه فرآورده	
نکته مهم		سری ساخت	
		جورینه	

^۱ MSDS: Material Safety Data Sheets





معرفی کیت حاضر

این کیت برای شناسایی و سنجش کمی ویروس هپاتیت ب (در پلاسما) با استفاده از فناوری Real-time PCR (روش TaqMan) طراحی و اعتبارسنجی^۱ شده است. شناسایی/سنجش کمی از طریق تکثیر یک ناحیه ۱۲۱ جفت بازی کاملاً حفظ شده^۲ از ژنوم ویروس و با استفاده از پروب اختصاصی مربوط (دارای رنگ فلئورسانس FAM در انتهای ۵' به عنوان گزارش کننده و BHQ1 در انتهای ۳' به عنوان خاموش کننده) انجام می شود. کنترل داخلی تعبیه شده در این کیت (دارای رنگ فلئورسانس JOE در انتهای ۵' به عنوان گزارش کننده و BHQ1 در انتهای ۳' به عنوان خاموش کننده)، صحت فرآیند استخراج و عدم وجود بازدارنده های احتمالی PCR را کنترل می کند.

محدودیت های بکار و محصول

- برای گرفتن نتایج بهینه، عملکرد دقیق مطابق راهنمای کاربری ضروری است.
- این محصول می بایست تنها توسط کاربری که برای انجام آزمایش های in-vitro مولکولی در آزمایشگاه تشخیصی آموزش های لازم را دیده است به کار گرفته شود.
- باید به تاریخ انقضای درج شده روی جعبه توجه شود و کیت تاریخ گذشته استفاده نشود.

¹ Validation

² Conserved





مختصری درباره Real-Time PCR

Real-time PCR در اصل همان واکنش PCR معمولی است با این تفاوت که با وارد کردن مواد فلوئورسان و استفاده از ابزاری برای پایش تغییرات فلوئورسانس این مواد، امکان بررسی واکنش در زمان انجام واکنش و نیز انجام محاسبات بعدی فراهم می‌آید.

از جمله برتری‌های Real-time PCR نسبت به PCR معمولی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. حساسیت بالاتر
۲. امکان کمی سازی
۳. حذف مراحل بعد از PCR^۱ (الکتروفورز محصول PCR، رنگ‌آمیزی و مشاهده ژل روی دستگاه نوردهی فرابنفش^۲) و در نتیجه:
 - استفاده نکردن از رنگ‌های سمی و سرطان‌زا مانند اتیدیوم بروماید
 - به حداقل رساندن آلودگی ناشی از محصول PCR (عدم گشودن درب تیوب‌ها بعد از اتمام واکنش)
 - کاهش خطاهای کاربری/ نیروی انسانی
۴. امکان خودکارسازی (اتوماسیون)

در حال حاضر مبانی شیمیایی متعددی برای Real-time PCR وجود دارد که در یک تقسیم‌بندی کلی شاید بتوان آن‌ها را به دو دسته عمده طبقه بندی کرد:

۱. روش‌های غیر اختصاصی^۳

در این نوع روش‌ها از رنگ‌های فلوئورسانسی استفاده می‌شود که به صورت غیر اختصاصی (مستقل از توالی) به هر دنا (DNA) دو رشته‌ای متصل می‌شوند (همانند SYBR Green). از آن‌جا که پیام^۴/ پاسخ دریافتی می‌تواند مربوط به هر دنا دو رشته‌ای باشد، در این روش برای اطمینان از صحت پیام (سیگنال) مشاهده شده می‌توان از بررسی‌های تکمیلی (منحنی ذوب دنا و ...) بهره جست.

¹ Post PCR

² UV Transilluminator

³ Non Specific Methods

⁴ Signal





۱. روش، و اختصاصی^۱

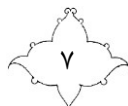
در این نوع روش‌ها از توالی‌های الیگونوکلیئوتیدی اختصاصی یا همان پروب‌ها (مکمل قسمتی از توالی هدف مورد جستجو با PCR) استفاده می‌شود که با رنگ‌های فلوئورسان نشاندار شده‌اند. انواع متعددی از پروب‌ها با طراحی‌ها و ویژگی‌های مختلف وجود دارند، ولی ویژگی مشترک تمامی آن‌ها ایجاد تغییرات در فلوئورسانس، در پی/ هنگام تکثیر هدف مورد جستجو است. در میان مبانی شیمیایی متعددی که برای روش اختصاصی ابداع شده، روش TaqMan از رواج - و بالطبع اهمیت بیشتری - برخوردار گشته است.

از جمله کاربردهای Real-time PCR (با گرایش کلینیکی) می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. بررسی وجود یا عدم وجود ژن‌های خاص (تومور مارکرها، ...)
۲. شناسایی و سنجش کمی عوامل بیماری‌زا
۳. تعیین ژنوتایپ عوامل بیماری‌زا
۴. پایش درمان‌های دارویی
۵. بررسی بیان ژن‌ها
۶. تشخیص‌های پیش از تولد
۷. پایش MRD^۲
۸. ...

^۱ Specific Methods

^۲ Minimal Residual Disease





ویروس هپاتیت ب و بیماری زایی

ویروس هپاتیت ب، یک دنا (DNA) ویروس پوشش‌دار^۱ متعلق به خانواده هپادناویریده^۲ است. بیش از ۳۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان جزو ناقلین مزمن این ویروس به حساب می‌آیند که این امر آن‌ها را در معرض خطر بالای ابتلا به سیروز، فاز انتهایی بیماری کبدی^۳ و کارسینومای هپاتوسلولار^۴ قرار می‌دهد. از نظر کلینیکی شمارگان دنا HBV بسیار متغیر است (از ۱۰^{۱۰} نسخه^۵ در هر میلی‌لیتر در عفونت حاد هپاتیت ب تا مقادیر خیلی پائین در ناقلین مزمن با آنتی‌ژن HBe منفی، بیماران تحت درمان ضد ویروسی و مبتلایان به عفونت HBV پنهان^۶). شناسایی و سنجش کمی این ویروس در پلاسما نقش مهمی در تشخیص و پایش عفونت هپاتیت ب و نیز پاسخ دارویی آن ایفا می‌کند.

رابطه تعداد نسخ ویروس و واحد بین‌المللی (IU)^۷

به خاطر عدم دقت روش‌های کنونی تعیین تعداد نسخ ویروس و یا اسیدهای نوکلئیک مربوط، سازمان بهداشت جهانی^۸ اقدام به تهیه و توزیع استانداردهای تیتروسی^۹ مربوط به برخی از عناوین ویروسی همانند هپاتیت ب نموده است.

غلظت استانداردهای به کار رفته در این کیت با استفاده از دومین استاندارد بین‌المللی سازمان بهداشت و سلامت جهانی^{۱۰} عیار (کالیبره) شده‌اند و نتایج این کیت بر حسب واحد بین‌المللی در واحد حجم (IU/μl یا IU/ml) گزارش می‌شود.

در خصوص رابطه بین تعداد نسخ و واحد بین‌المللی، اعداد گوناگونی (بین ۲ تا ۱۰ نسخه از ویروس هپاتیت ب به ازای هر واحد بین‌المللی) ذکر شده است که این اعداد نه قابل اعتماد و نه مفید هستند.

¹ Enveloped DNA Virus

² Hepadnaviridae

³ End-stage Liver Disease

⁴ Hepatocellular Carcinoma

⁵ Copy

⁶ Occult HBV

⁷ IU: International Unit

⁸ WHO: World Health Organization

⁹ Viral Loads

¹⁰ 2nd WHO International Standard for Hepatitis B Virus DNA Nucleic Acid Amplification Techniques, code: 97/750.





ویژه‌ی عملکردهای

حساسیت تحلیلی^۱

حد تشخیص تحلیلی^۲ "کیت شناسایی و سنجش کمی ویروس هپاتیت ب در پلاسما" به دو روش الف) مستقل از حساسیت روش استخراج به کار رفته و ب) با در نظر گرفتن حساسیت روش استخراج به کار رفته تعیین شده است.

در حالت الف، یک سری رقت متوالی از غلظت اسمی ۱ تا $0.01 \text{ IU}/\mu\text{l}$ از دنای HBV آماده و با استفاده از این کیت ارزیابی شدند. استفاده از ۱۰ تکرار از هر نمونه و انجام آزمون منجر به تعیین حساسیت تا $0.05 \text{ IU}/\mu\text{l}$ گردید (با pValue معادل ۰/۰۵). این بدان معنی است که به احتمال بیش از ۹۵٪، مقادیر $0.05 \text{ IU}/\mu\text{l}$ قابل شناسایی خواهد بود.

در حالت ب نیز با استفاده از نتایج به دست آمده، حساسیت معادل $50 \text{ IU}/\text{ml}$ (با pValue معادل ۰/۰۵) به دست آمد. این بدان معنی است که به احتمال بیش از ۹۵٪، مقادیر $50 \text{ IU}/\text{ml}$ از دنای HBV قابل شناسایی خواهد بود.

ویژه‌ی تحلیلی^۳

ویژگی (اختصاصیت) تحلیلی "کیت شناسایی و سنجش کمی ویروس هپاتیت ب در پلاسما" ساخت شرکت تکاپوزیست در مرحله اول با انتخاب و طراحی مناسب پرایمرها، پروب‌ها و شرایط دقیق واکنش، تضمین شده است.

در مرحله بعد، توانایی شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف ویروس هپاتیت ب (ژنوتیپ‌های A تا G) با استفاده از پانل WHO ژنوتیپ‌های ویروس هپاتیت ب^۴ مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

^۱ Analytical Sensitivity

^۲ Limit of Detection (LOD)

^۳ Analytical Specificity

^۴ 1st WHO International Reference Panel for Hepatitis B Virus Genotypes for Nucleic Acid Amplification Techniques -Based Assays





آیا تیترو ویروس محاسبه شده (بر حسب IU) در محدوده اعلام شده قرار دارد؟	تیترو ویروس محاسبه شده (بر حسب IU) Log_{10}	شناسایی با کیت حاضر	ژنوتیپ
بله	۶/۰۶	+	A1
بله	۵/۸۷	+	A2
بله	۵/۷۴	+	B2
بله	۳/۸۴	+	B4
بله	۵/۸۲	+	C2
بله	۶/۰۳	+	D1
بله	۵/۹۵	+	D3
بله	۶/۰۲	+	E
بله	۵/۰۲	+	F2
بله	۳/۹۳	+	G

همچنین، آزمون از نظر واکنش متقاطع^۱ با منابع ذکر شده در جدول زیر مورد بررسی قرار گرفت که با هیچ یک از آن‌ها واکنش متقاطعی دیده نشد.

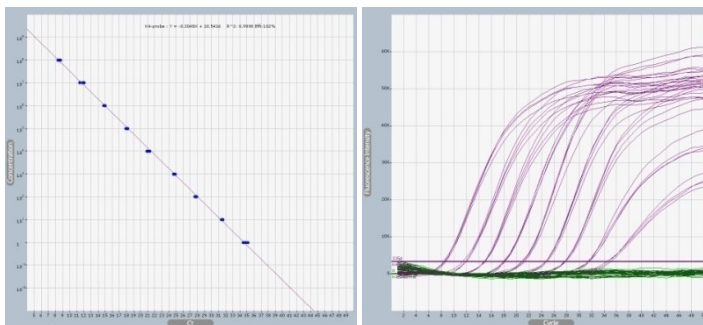
نتایج	مشخصات
منفی	Human Herpes Simplex virus type 1
منفی	Human Herpes Simplex virus type 2
منفی	Varicella Zoster Virus (Type B)
منفی	Human Cytomegalovirus
منفی	Epstein-Barr Virus
منفی	2nd WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay
منفی	WHO 2nd International Standard For Hepatitis C Virus RNA for Genomic Amplification Technology Assays
منفی	و دئای (DNA) ژنومی انسان

^۱ Cross Reactivity



بازه خطی^۱

بازه خطی (سنجش تحلیلی) "کیت شناسایی و سنجش کمی ویروس هپاتیت ب در پلاسما" با تجزیه و تحلیل یک سری از رقت‌های استاندارد دناي HBV در بازه 1×10^8 IU/ μ l تا 1×10^{-2} IU/ μ l تعیین شد. نتیجه نشان می‌دهد که بازه خطی این کیت، از غلظت حداقل ۱ IU/ μ l تا 1×10^8 IU/ μ l را تحت پوشش قرار می‌دهد.



دقت^۲

داده‌های دقت "کیت شناسایی و سنجش کمی ویروس هپاتیت ب در پلاسما" امکان تعیین وردایی^۳ کلی آزمون را فراهم می‌آورد. وردایی کل محاسبه شده متشکل است از:

۱. وردش درون آزمونی^۴ (تغییرپذیری/ متغیر بودن نتایج چندین نمونه مشابه با غلظت‌های یکسان در یک آزمایش)،

۲. وردش بین آزمونی^۵ (تغییرپذیری/ متغیر بودن نتایج آزمون‌هایی که توسط کاربران مختلف با دستگاه‌های مختلف از یک نوع و در یک آزمایشگاه، حاصل شده است).

داده‌های دقت کیت با استفاده از دو نمونه از استانداردهای کمی سنجی (استاندارد: ۳ IU/ μ l و ۱۰۰۰ IU/ μ l) جمع‌آوری شدند.

^۱ Linear range

^۲ Precision

^۳ Variance

^۴ Intra assay variation

^۵ Inter assay variation





آزمون در ۲۰ روز مختلف توسط کاربران متفاوت و با استفاده از ۱۰ تکرار روی هر نمونه و با استفاده از یک دستگاه ثابت انجام شد. داده‌های به دست آمده برای تعیین انحراف معیار^۱، واریانس و ضریب وردش^۲ واکنش PCR اختصاصی پاتوژن استفاده شدند. داده‌های دقت بر مبنای مقادیر چرخه آستانه^۳ (C_t) محاسبه شدند. همچنین از روی این مقادیر، داده‌های نتایج کمی بر حسب IU/μl نیز محاسبه گردید.

نام آزمون	انحراف معیار بر حسب Ct	وردایی (واریانس) بر حسب Ct	CV بر حسب Ct	انحراف معیار بر حسب IU	وردایی (واریانس) بر حسب IU	CV بر حسب IU
وردش درون آزمونی Intra Assay variation	۰/۰۹۵	۰/۰۰۹	۰/۳۴ %	۵۵/۵۵	۳۰۸۶	۶/۲۳ %
وردش بین آزمونی Inter Assay variation	۰/۳۶	۰/۱۸	۱/۲۳ %	۲۴۴	۶۸۸۵۹	۲۲/۷۹ %
وردایی کل Total variance	۰/۳۷	۰/۱۹	۱/۲۹ %	۲۵۰/۲۴	۷۱۹۴۵	۲۳/۰۱ %

جدول ۱: داده‌های دقت برای استاندارد شماره ۳ (دستگاه Exicycler96)

نام آزمون	انحراف معیار بر حسب Ct	وردایی (واریانس) بر حسب Ct	CV بر حسب Ct	انحراف معیار بر حسب IU	وردایی (واریانس) بر حسب IU	CV بر حسب IU
وردش درون آزمونی Intra Assay variation	۰/۱۴	۰/۰۲	۰/۴۲ %	۱/۰۳	۱/۰۶	۹/۴۳ %
وردش بین آزمونی Inter Assay variation	۰/۴	۰/۱۶	۱/۱۳ %	۲/۵	۶/۲۵	۲۳/۷۹ %
وردایی کل Total variance	۰/۴۲	۰/۱۸	۱/۱۸ %	۲/۷۰	۷/۳۱	۲۹/۶۸ %

جدول ۲: داده‌های دقت برای استاندارد شماره ۵ (دستگاه Exicycler96)

¹ SD: Standard Deviation

² CV: Coefficient of Variation

³ C_t: Cycle of threshold



نام آزمون	انحراف معیار Ct بر حسب	وردایی (واریانس) Ct بر حسب	CV Ct بر حسب	انحراف معیار IU بر حسب	وردایی (واریانس) IU بر حسب	CV IU بر حسب
وردش درون آزمونی Intra Assay variation	۰/۱۱	۰/۰۱۲	۰/۳۵ %	۷۹/۴۳	۶۳۰۹/۱۳	۷/۴۱ %
وردش بین آزمونی Inter Assay variation	۰/۲۷	۰/۷۳	۰/۹۱ %	۱۷۶/۳۲	۳۱۰۸۸/۷۴	۱۸/۴ %
وردایی کل Total variance	۰/۲۹	۰/۰۹	۰/۹۵ %	۱۹۳/۳۹	۳۷۳۹۷/۸۷	۲۰/۳۰ %

جدول ۳: داده‌های دقت برای استاندارد شماره ۳ (دستگاه Rotor Gene Q)

نام آزمون	انحراف معیار Ct بر حسب	وردایی (واریانس) Ct بر حسب	CV Ct بر حسب	انحراف معیار IU بر حسب	وردایی (واریانس) IU بر حسب	CV IU بر حسب
وردش درون آزمونی Intra Assay variation	۰/۲۱	۰/۰۴۴	۰/۵۴ %	۱/۳۴	۱/۸۰	۱۴/۳۸ %
وردش بین آزمونی Inter Assay variation	۰/۳۷	۰/۱۴	۰/۹۷ %	۱/۷۹	۳/۲۰	۲۳/۸۴ %
وردایی کل Total variance	۰/۴۳	۰/۱۸	۱/۱۲ %	۲/۲۴	۵/۰۰	۲۹/۲۷ %

جدول ۴: داده‌های دقت برای استاندارد شماره ۵ (دستگاه Rotor Gene Q)



ارزیابی تشخیصی^۱

برای برآورد ارزیابی تشخیصی کیت، حساسیت و ویژگی (اختصاصیت) بالینی کیت مورد بررسی قرار گرفت.

حساسیت بالینی (کلینیکی):

برای این منظور ۱۱۰ نمونه HBV مثبت تأیید شده (با تیتراژ گزارش شده بین ۱۰ تا 10^7 IU/ml) مورد آزمایش قرار گرفتند.

از این تعداد ۱۰۶ نمونه مثبت تشخیص داده شدند بنابراین حساسیت کلینیکی کیت، ۹۶/۳۶٪ برآورد شد.

ویژگی (اختصاصیت) بالینی:

برای این منظور ۱۰۴ عدد نمونه منفی مورد آزمایش قرار گرفتند.

از این تعداد ۱۰۱ نمونه منفی به درستی منفی تشخیص داده شدند بنابراین اختصاصیت کلینیکی کیت، ۹۷/۱۱٪ برآورد شد.

^۱ Diagnostic Evaluation

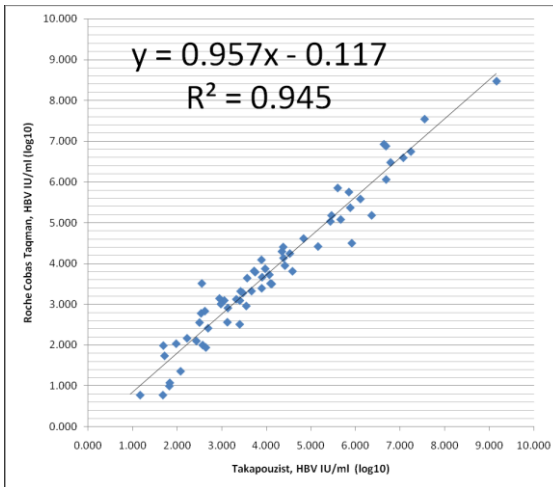
^۲ Clinical Sensitivity

^۳ Clinical Specificity



همبستگی نتایج کلینیکی با روش های معتبر دیگر :

مقایسه نتایج آزمون های انجام شده (روی ۷۰ نمونه) با استفاده از کیت تولیدی تکاپوزیست و کیت Cobas Taqman HBV شرکت Roche نشان دهنده همبستگی بیش از ۹۴٪ نتایج به دست آمده در بازه وسیعی از غلظت ها است.





سر مواد و وسایل مورد نیاز (در کیت ارائه نشده است)

- دستکش‌های آزمایشگاهی سنتتیک (نیتریل/وینیل) یکبار مصرف **بدون پودر**.
- کیت استخراج دنا (DNA) (دستی یا مخصوص دستگاه استخراج خودکار)
- سمپلر (متغیر)
- سر سمپلرهای فیلتردار استریل عاری از نوکلئازها^۱
- لرزانک (ورتنکس^۲)
- چرخانک (اسپین^۳)
- میکروپیوژ با دور ۲۰۰۰۰ g
- نوار^۴ یا میکروتیوب‌های مخصوص Real-time PCR متناسب با دستگاه
- دستگاه Real-time PCR دارای کانال‌های شناسایی پیام (سیگنال)های FAM و JOE، و یا کانال‌هایی برای شناسایی سیگنال رنگ‌هایی با طول موج مشابه
- هود PCR
- مارژیک (مارکر)

توصیه‌های عمومی

- از سرسمپلرهای استریل فیلتردار استفاده نمایید.
- همواره قبل و بعد از انجام آزمون سطح زیر هود/میز را با پنبه آغشته به الکل ۷۰٪ کاملاً تمیز کرده، سپس به مدت ۵ دقیقه با پرتوی فرابنفش پرتو دهی کنید.
- برای آلودگی‌زدایی مواد زائد شامل سرسمپلرها، تیوب‌ها، استریپ‌های حاوی محصول PCR و ...، آن‌ها را پس از مصرف به مدت ۱ ساعت در آب ژاول (وایتکس) ۱۰٪ غوطه‌ور کنید.

^۱ DNase RNase Free

^۲ Vortex

^۳ Spin

^۴ Strip





- نمونه‌های مثبت (اعم از پلاسما، کنترل‌ها و محصول PCR) را به دور از مواد دیگر، استخراج و نگهداری نموده، در فضای جداگانه‌ای آن‌ها را به مخلوط واکنش اضافه نمایید.
- پیش از انجام واکنش دقت نمایید که همه اجزا در دمای اتاق کاملاً ذوب شده باشند.
- هنگامی که اجزای کیت ذوب شد، آن‌ها را ۱۰ ثانیه با لرزانک (ورتنکس) مخلوط کنید و سپس با استفاده از چرخانک (اسپین) از تجمع محتویات لوله‌ها در انتهای آن‌ها (پائین آمدن مواد از دیواره‌ها) مطمئن شوید.

جمع آوری، نگهداری و حمل و نقل نمونه

اعتبارسنجی این کیت با استفاده از نمونه‌های پلاسمای ا.د.ت.^۱ دار (بین ۱/۵ تا ۲ میلی گرم نمک پتاسیم EDTA به ازای هر میلی لیتر از خون) انجام شده است. نمونه‌های دیگر اعتبارسنجی نشده اند.

پلاسمای ا.د.ت.^۲ دار یا سیتراته^۲ به عنوان بهترین نمونه برای تشخیص ویروس هپاتیت ب توصیه شده است.



نگهداری نمونه

حداکثر تا ۶ ساعت پس از خون‌گیری، خون کامل می‌بایست با سانتریفیوژ کردن برای ۲۰ دقیقه با ۸۰۰ تا ۱۶۰۰g به پلاسما و اجزای سلولی تفکیک گردد. پلاسمای جدا شده باید به میکروتیوب‌های استریل منتقل گردد. اگر نمونه را منجمد سازید یا برای مدت طولانی نگاه دارید ممکن است حساسیت آزمون کاهش یابد.

¹ E.D.T.A

² Citrated



حمل و نقل نمونه ها

به عنوان یک اصل کلی همه نمونه‌ها می‌بایست بالقوه بیماری‌زا تلقی شوند. نمونه‌ها باید در محفظه-ای مقاوم جابجا شوند تا از خطر انتشار آلودگی پیش‌گیری شود. نمونه‌ها می‌بایست مطابق دستورالعمل‌های محلی و ملی برای حمل مواد بیماری‌زا جابجا شوند. در صورتی که خون‌گیری در محلی غیر از محل نگهداری نمونه/آزمایشگاه انجام شد، نمونه‌ها باید ظرف مدت ۶ ساعت به مقصد برسند. نمونه‌های خون می‌بایست در شرایط خنک ($+2^{\circ}\text{C}$ تا $+8^{\circ}\text{C}$) و نمونه‌های پلاسما به صورت منجمد (-20°C) حمل شوند.

مواد تداخل کننده

مقادیر بالای بیلی‌روبین ($\geq 15 \text{ mg/dl}$) و لیپیدها ($\geq 800 \text{ mg/dl}$) و نمونه‌های همولیز شده واکنش را تحت تاثیر قرار نمی‌دهند ولی هپارین ($\geq 10 \text{ IU/ml}$) موجب مهار/حذف/کاهش کارایی واکنش PCR می‌شود. نمونه‌هایی که در میکروتیوب‌های حاوی هپارین به عنوان ماده ضد انعقاد جمع‌آوری شده‌اند، نباید مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، نمونه بیمارانی که هپارین دریافت کرده‌اند نیز نباید مورد استفاده قرار گیرند.



مع ی ا ج ی کیت

در این کیت اجزای زیر وجود دارند:

• مخلوط ۱ (Mix1)

این مخلوط حاوی مواد لازم برای انجام واکنش PCR شامل آنزیم، dNTP ها و بافر مربوط است.

• مخلوط ۲ (Mix2)

این مخلوط حاوی پرایمرها و پروب‌های لازم برای شناسایی و تکثیر دنا ی ویروس و کنترل داخلی اضافه شده به نمونه‌ها است.

• استانداردهای سنجش کمی شماره ۱ تا ۵

این استانداردها (با میزان مشخص تیر و ویروس بر حسب IU) امکان ترسیم یک نمودار استاندارد را فراهم می‌آورد. معادله حاکم بر این نمودار استاندارد برای انجام کلیه محاسبات سنجش کمی و تعیین تیر و ویروس در نمونه استخراج شده مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین این نمودار کارایی^۱ واکنش PCR انجام شده و نیز ضریب رگرسیون نقاط استاندارد (R^2) را تعیین می‌کند. در یک واکنش PCR موفق باید شرایط زیر حاکم باشد:

$$R^2 > 0.99 \text{ و } e_{PCR} > 90\%$$

• کنترل داخلی (PC)^۲

کنترل داخلی یک قطعه دنا ی خارجی است که به هر نمونه‌ای که قرار است دنا ی آن استخراج شود افزوده می‌شود. در صورت کارایی مناسب کیت استخراج مورد استفاده، انجام صحیح فرآیند استخراج و عدم وجود بازدارنده‌های احتمالی PCR، این دنا ی خارجی در واکنش PCR تکثیر شده و با استفاده از پروب اختصاصی مربوط شناسایی می‌شود. در این حالت تفاوت چرخه آستانه (C_t) کنترل داخلی در نمونه پلاسما ی منفی که تحت فرآیند استخراج قرار گرفته می‌بایست 3 ± 37 باشد. این میزان پراکندگی به جهت تفاوت در تجهیزات و فرآیند خالص سازی ایجاد می‌شود.

¹ Efficiency (e_{PCR})

² Internal Positive Control



انحراف بیش از این دلالت بر بروز مشکل در فرآیند خالص سازی دارد. در این موارد فرآیند استخراج می بایست کنترل و در صورت لزوم کل آزمون از مرحله استخراج تا آزمون Real-time دوباره تکرار شود.

مهم: در صورت عدم مشاهده منحنی کنترل داخلی در نمونه منفی استخراج شده، یکی از علل مهم ممکن است کارایی نامناسب کیت/ روش استخراج استفاده شده باشد. در این حالت استخراج را با کیت دیگری (کیت توصیه شده در این راهنمای کاربری) انجام دهید و مجدداً آزمون Real-time را تکرار کنید. در هر حالت امکان گزارش جواب منفی برای نمونه منفی که کنترل داخلی آن جواب نداده است وجود ندارد.

• کنترل منفی (N.T.C)^۱

کنترل منفی، نمونه پلاسمایی است که از نظر وجود دنای HBV منفی است. این پلاسما همانند یک نمونه و با اضافه کردن کنترل داخلی به آن استخراج می شود. وجود سیگنال کنترل داخلی (JOE) در این نمونه منفی و عدم وجود سیگنال HBV (FAM) می تواند به عنوان مبنایی جهت تأیید موارد زیر مورد استفاده قرار گیرد:

۱. صحت فرآیند استخراج دنا
۲. مهیا بودن شرایط برای واکنش PCR (عدم وجود بازدارنده ها در دنای استخراج شده و ...)

چرخه آستانه (C₁) کنترل داخلی در این نمونه می بایست 37 ± 3 باشد.

¹ No Template Control





روش کار

استخراج دنا (DNA)

کیت‌های استخراج دنا توسط سازندگان بسیاری ارایه می‌گردد. میزان نمونه مورد نیاز برای فرآیند استخراج دنا بسته به روش کار، متفاوت است. لطفاً فرآیند استخراج دنا را مطابق دستورالعمل تولید کننده به انجام رسانید.

توصیه می‌شود از دستگاه‌های خودکار استخراج اسیدهای نوکلئیک استفاده کنید. این امر می‌تواند موجب افزایش حساسیت و کاهش/ حذف احتمال آلودگی از یک نمونه به نمونه دیگر^۱ شود. لازم به ذکر است که اعتبارسنجی این کیت با استفاده از روش استخراجی با کارایی بیش از ۷۰٪ صورت گرفته است. در زیر به کیت استخراج مناسب که می‌تواند کارایی بیش از ۷۰٪ داشته باشند، اشاره شده است:

نام کیت	شناسه (Cat#)	سازنده
کیت استخراج اسیدهای نوکلئیک ویروسی (DNA/RNA) DynaBio Viral Nucleic Acid Extraction Mini Kit	ک ج ۰۰۲۵	تکاپوزیست

برای کنترل و پایش فرآیند استخراج در هر نمونه، کنترل داخلی را به نسبت ۱۰٪ حجم بافر رهاسازی (Elution Buffer) به فرآیند استخراج اضافه نمایید. برای مثال اگر دنا (DNA) را در ۵۰ میکرولیتر بافر جمع آوری می‌کنید، در ابتدا می‌بایست ۵ میکرولیتر کنترل داخلی اضافه شود.

 کنترل داخلی را مستقیماً به نمونه اضافه نکنید. توصیه می‌شود این کار بلافاصله پس از اضافه کردن بافر اتصال به نمونه انجام شود.

کنترل داخلی طراحی شده در این کیت از نوع رقابتی است بنابراین از چندگانه^۲ کردن واکنش و کاهش حساسیت آزمون جلوگیری به عمل آمده است. همچنین با توجه به غلظت پائین کنترل داخلی تعبیه شده در کیت، رقابتی بودن آن موجب کاهش تأثیرگذاری بر حساسیت آزمون (در محدوده بازه خطی آن) نمی‌شود.

پیام کنترل داخلی فقط در نمونه‌های منفی یا نمونه‌هایی با تیتراژ پائین ویروس مشاهده می‌شود. در نمونه‌های با تیتراژ بالای ویروس، پیام (سیگنال) کنترل داخلی مشاهده نشده و یا به طور ضعیفی مشاهده می‌شود.

^۱ Cross Contamination

^۲ Multiplex



انجام آزمون Real-time PCR

نکات عمومی

۱. قبل از شروع به انجام آزمون روی یک برگه کاغذ طراحی آزمون و مقادیر مورد نیاز از مواد، لوازم و ... را بنویسید تا در هنگام کار دچار خطا نشوید.
۲. ابتدا برنامه‌ریزی دستگاه‌تان را انجام داده، دستگاه را آماده به کار کنید سپس اقدام به خروج مواد از فریزر و آماده سازی آن‌ها برای انجام آزمون نمایید.
۳. از کالیبره بودن سمپلرهایتان اطمینان حاصل کنید.
۴. قبل از انجام آزمون از ذوب شدن کامل موادی که از فریزر بیرون آورده‌اید مطمئن شوید.
۵. همواره مخلوط واکنش را به میزان ۵٪ بیش از میزان مورد نیاز آماده کنید تا با مشکل کمبود مخلوط (به دلیل خطاهای کاربری، نمونه‌ریزی^۱، چسبیدن مواد به دیواره‌ها و ...) در حین انجام کار مواجه نشوید.
۶. برای مخلوط کردن مواد از پیپتاژ و لرزان کردن (ورتنس) و برای پائین آوردن مواد از دیواره‌ها از چرخان کردن (اسپین) استفاده کنید.
۷. برای ترسیم منحنی استاندارد دقیق و جلوگیری از برآورد نادرست^۲ مقادیر، استفاده از هر ۵ نمونه استاندارد توصیه می‌شود. برای اطمینان بیشتر نسبت به نتایج آزمون می‌توان نمونه‌ها/ استانداردها را به صورت دوتایی^۳ مورد استفاده قرار داد.

¹ Sampling

² Under or Over estimation

³ Duplicate





آماد سازی مخلوط اصلی واکنش

مقادیر لازم برای ساختن مخلوط اصلی واکنش برای یک آزمون مطابق جدول زیر است:

نام	حجم به میکرولیتر
مخلوط ۱	۱۲/۵
مخلوط ۲	۲/۵

مخلوط اصلی واکنش (مخلوط ۱ + مخلوط ۲) را برای تعداد کل نمونه‌ها به اضافه ۵٪ در یک تیوب ۲ میلی‌لیتری استریل (عاری از نوکلئازها) آماده کنید.

حداقل تعداد کل نمونه‌ها در یک دور واکنش عبارت است از:

نام	تعداد
استانداردهای سنجش کمی	۵
کنترل منفی استخراج شده	۱
آب تزریقی (کنترل منفی PCR)	۱
کنترل مثبت (در صورت استفاده)	-
نمونه‌های مجهول (بیمار) استخراج شده	X
جمع کل	X+۷

در هر تیوب مخصوص Real-time PCR، ۱۵ میکرولیتر از مخلوط آماده شده و ۱۰ میکرولیتر از دمای نمونه مورد آزمایش/ استانداردها/ کنترل منفی‌ها اضافه کرده، ابتدا به آرامی پیپتاژ کرده، سپس در تیوب/ استریپ‌ها را بسته یا با برچسب مخصوص کاملاً پوشانده و محکم کنید. تیوب/ استریپ‌ها را چرخان کنید و در مکان مربوط در دستگاه قرار دهید. دقت کنید تا هر نمونه در جایگاه تعریف شده خود قرار بگیرد.

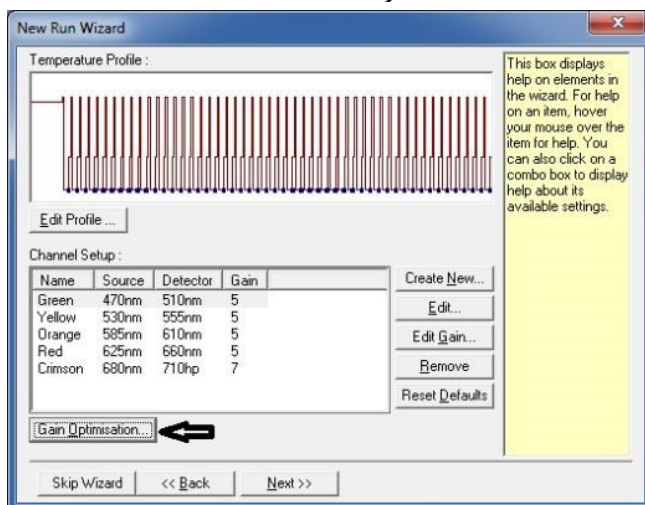


برنامه واکنش PCR

تکرار	زمان	دما (درجه سانتیگراد)
۱ چرخه	۵ دقیقه	۹۵
۵۰ چرخه	۱۵ ثانیه	۹۵
	۵۰ ثانیه	۵۸
	-	خوانش (Scan) فلوئورسانس نمونه ها • FAM برای HBV • JOE برای کنترل داخلی

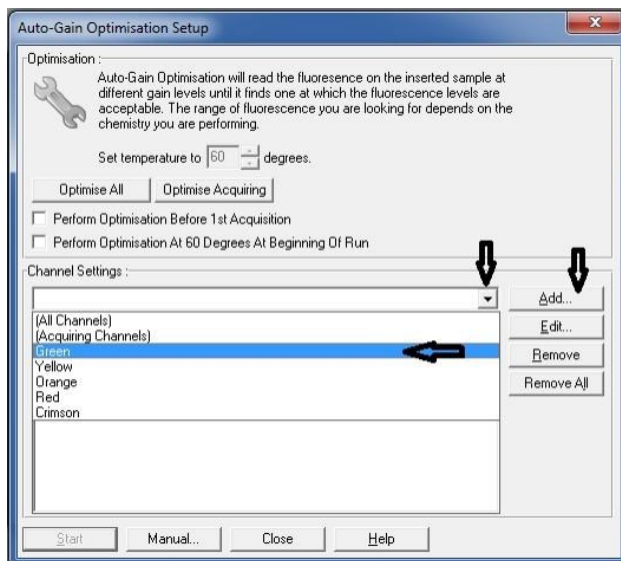
نکته:

۱. در دستگاه های برند Rotorgene، پس از دادن برنامه دمایی و پیش از شروع به کار دستگاه: روی OK کلیک کنید تا شکل زیر ظاهر شود. سپس روی Gain Optimisation کلیک کنید تا وارد صفحه Auto-Gain Optimisation Set Up شوید.

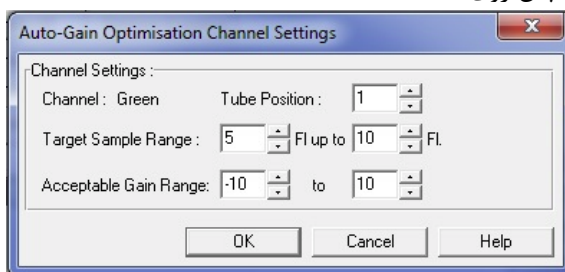




سپس در صفحه Auto-Gain Optimisation Set Up، از منوی بازشونده، Green را انتخاب کرده و سپس روی Add کلیک کنید.



پس از ظاهر شدن پنجره زیر، در قسمت Target Sample Range حد پائین را روی ۵ و حد بالا را روی ۱۰ قرار دهید و سپس روی Ok کلیک کنید.



همین کار را برای رنگ Yellow نیز تکرار کنید.



همانند شکل زیر، ابتدا دما را در قسمت set temperature روی ۵۸ درجه تنظیم نمایید. سپس گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را تیک بزنید و روی Close کلیک کنید.

Auto-Gain Optimisation Setup

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 degrees. ←

☒ Perform Optimisation Before 1st Acquisition ←

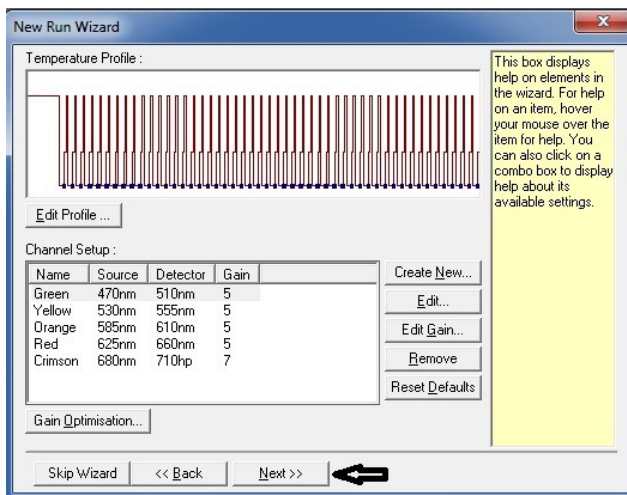
☐ Perform Optimisation At 58 Degrees At Beginning Of Run

Channel Settings :

Name	Tube Position	Min Reading	Max Reading	Min Gain	Max Gain
Green	1	5FI	10FI	-10	10
Yellow	1	5FI	10FI	-10	10



همانند شکل زیر روی Next کلیک کنید.



۲. در دستگاه های برند Rotorgene بعد از انجام واکنش و در زمان آنالیز نتایج : کنترل کنید که گزینه Dynamic Tube انتخاب شده باشد، در غیر اینصورت روی آن کلیک کنید تا حروف آن آبی رنگ شوند. / روی گزینه Slope Correct کلیک کنید. / روی گزینه Auto Scale کلیک کنید. / روی گزینه Linear Scale کلیک کنید. حد آستانه (Threshold) را بین ۰/۰۳ تا ۰/۰۵ قرار دهید.



تحلیل داد ها

در وهله اول شروط زیر باید برقرار باشد تا اطمینان حاصل شود نتایج قابل اتکا هستند:

- کارایی واکنش بین ۹۰ تا ۱۰۵٪ باشد.
- $R^2 > 0.9$ باشد.
- Ct کنترل داخلی (JOE) در کنترل منفی استخراج معادل 3 ± 37 باشد.
- پیام FAM در کنترل منفی استخراج مشاهده نشود.
- پیام FAM و JOE در کنترل منفی PCR مشاهده نشود.

در صورت برقرار نبودن هریک از شروط بالا، آزمون نامعتبر است و بایستی برای یافتن و حل مشکل به ترتیب مراحل: PCR، استخراج و نمونه گیری، تکرار گردد.

* **حد آستانه مثبت:** از سیگنال هایی که در چرخه های بالاتر از ۴۰ دیده می شوند ($C_t \geq 40$) باید چشم پوشی کرد (اعم از نمونه، کنترل منفی و...).

در صورت برقرار بودن شروط بالا:

HBV (FAM)	+	-	-
کنترل داخلی (JOE)	*+/-	+	-
نتیجه آزمون (Result)	مثبت	منفی	نامعتبر (تکرار شود)

* غلظت های بالای دنا ویروس می تواند منجر به کاهش یا حذف سیگنال کنترل داخلی گردد.



معنای نتایج

موارد زیر به عنوان نتایج آزمون محتمل است. روندنمای تفسیر نتایج و گزارش نهایی در صفحه بعد آمده است.

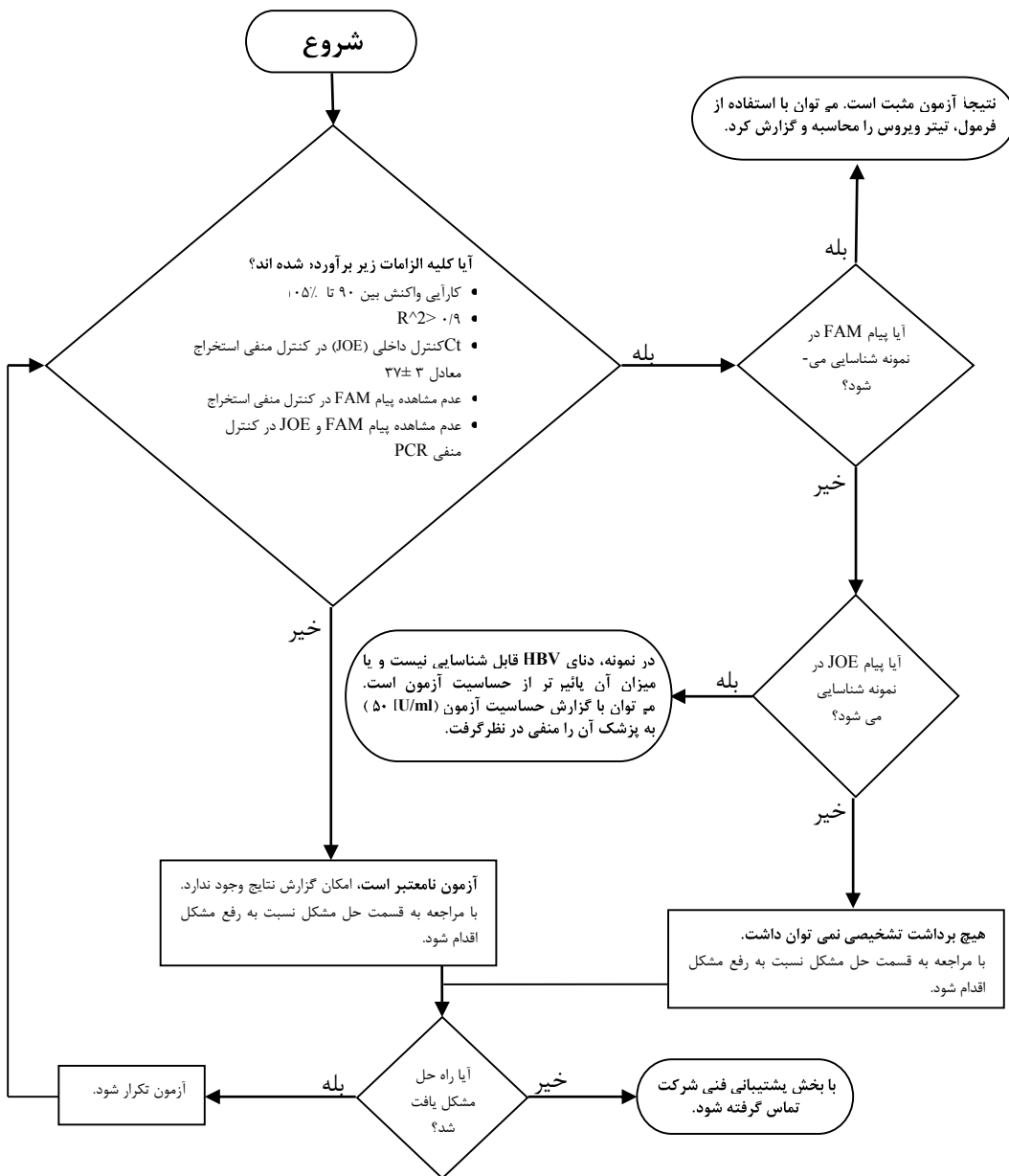
۱. پیام (سیگنال) FAM در نمونه شناسایی ولی در کنترل‌های منفی شناسایی نمی‌شود.
نتیجه آزمون مثبت است: نمونه حاوی دنای (DNA) ویروس هپاتیت ب است.
 در این حالت، ممکن است پیام JOE دیده نشود. زیرا غلظت‌های بالای دنای HBV می‌تواند منجر به کاهش یا حذف سیگنال کنترل داخلی گردد.
۲. پیام (سیگنال) FAM هم در نمونه و هم در کنترل‌های منفی شناسایی می‌شود.
احتمال نتیجه مثبت کاذب وجود دارد: آزمون می‌بایست مجدداً تکرار شود (رجوع شود به قسمت حل مشکل)^۲
۳. پیام (سیگنال) FAM در نمونه شناسایی نمی‌شود ولی پیام JOE (مربوط به کنترل داخلی) در نمونه شناسایی می‌شود ($C_t = 37 \pm 3$). در این حالت پیام کنترل داخلی احتمال وجود بازدارنده PCR را رد می‌کند و بنابراین:
- در نمونه، دنای HBV قابل شناسایی نیست و یا میزان آن پائین تر از حساسیت آزمون است. می‌توان با گزارش حساسیت آزمون به پزشک آن را منفی در نظر گرفت.**
۴. نه پیام (سیگنال) FAM و نه پیام JOE در نمونه شناسایی نمی‌شوند.
هیچ برداشت تشخیصی نمی‌توان داشت.
 اطلاعات مربوط به منشأ خطا و راه حل‌های آن را در قسمت **حل مشکل** می‌توان یافت.

¹ Flowchart

² Trouble Shooting



روندنمای تفسیر نتایج و گزارش نهایی





تعیین تیترو ویروس بر حسب IU در هر میلی لیتر پلاسما

استانداردهای کمیت سنجی این کیت با استفاده از دوّمین استاندارد بین‌المللی سازمان بهداشت و سلامت جهانی (WHO) کالیبره شده و بر حسب IU/μl هستند. برای تعیین IU ویروس در هر میلی‌لیتر از پلاسمای بیمار از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result (IU/ml)} = \frac{\text{Result (IU/}\mu\text{l)} \times \text{Elution Volume (}\mu\text{l)}}{\text{Sample Volume (ml)}}$$

برای مثال اگر :

- حجم نمونه سرم / پلاسمای مورد استخراج: ۲۰۰ میکرولیتر
 - حجم محصول نهایی استخراج شده: ۵۰ میکرولیتر
 - و تیترو به دست آمده برای نمونه: IU/μl ۱۰۰ باشد
- نتیجه نهایی به صورت زیر محاسبه خواهد شد.

$$\text{نتیجه (IU/ml)} = \frac{۵۰ \times ۱۰۰}{۰/۲}$$

در نتیجه، تیترو قابل گزارش حدود IU/ml ۲۵,۰۰۰ در پلاسمای بیمار خواهد بود.
 ⚠ در نظر داشته باشید که تنها در صورت برقرار بودن شرایط زیر امکان تعیین و گزارش تیترو وجود دارد و در غیر اینصورت می‌بایست آزمون مجدداً تکرار شود.

$$R^2 > ۰/۹ \text{ و } \text{ePCR} > ۱۰۵\%$$

نکته: در برگه گزارشی که برای پزشک آماده می‌کنید حتماً باید به محدوده بازه خطی، حساسیت تحلیلی آزمون و مشخصات کیت مورد استفاده اشاره شود.

لطفاً توجه داشته باشید که به عنوان یک اصل کلی، حجم اولیه نمونه مورد استخراج در معادله فوق لحاظ می‌گردد بنابراین هنگامی که حجم نمونه مورد استفاده در فرآیند استخراج دچار تغییر می‌شود (مثلاً تغلیظ نمونه با سانتریفیوژ کردن و یا افزایش حجم با استفاده از بافر فسفات نمکی^۱ برای رساندن آن به میزان مورد نیاز فرآیند استخراج) این تغییر می‌بایست در نظر گرفته شود.

^۱ PBS



حل مشکل

نشانه (symptom)	علت احتمالی	راه حل
عدم مشاهده پیام فلورسانس FAM در نمونه های استاندارد ۵ تا ۱	عدم انتخاب FAM در هنگام تعریف پروب PCR	به منظور تحلیل صحیح داده ها، می بایستی برای HBV PCR رنگ FAM و برای کنترل داخلی رنگ JOE انتخاب شود.
	شرایط PCR با آنچه در کیت آمده است همخوانی ندارد.	۱- پروفایل دمایی را با آنچه در روش کار آمده مقایسه کنید. ۲- در پروفایل دمایی برنامه PCR مرحله خوانش فلورسانس به طور صحیح انتخاب نشده است.
	آماده سازی مخلوط واکنش PCR یا ریختن مواد در تیوب ها به صورت نادرست انجام شده است. ممکن است در هنگام آماده سازی مخلوط واکنش دچار خطا شده اید. ممکن است نمونه ها را به طور صحیح در تیوب های مربوط نریخته باشید (جابجا ریخته باشید) یا پلیت/ نوارها/ میکروتیوب ها را دقیقاً در جایگاه های تعریف شده در دستگاه قرار نداده باشید و ...	مراحل کاری/ محاسبات خود را به صورت کامل کنترل کنید و در صورت لزوم آزمایش را تکرار کنید.
	شرایط نگهداری یک یا تعداد بیشتری از اجزای کیت مطابق آنچه که در راهنمای کاربری کیت آمده است نبوده و یا این که تاریخ استفاده از کیت به اتمام رسیده است.	لطفاً شرایط نگهداری و تاریخ انقضای مواد را کنترل کرده و در صورت لزوم از کیت جدیدی استفاده کنید.
پیام ضعیف یا عدم مشاهده پیام JOE کنترل داخلی در نمونه و یا کنترل منفی ای که در فرآیند استخراج وارد شده است (Ct) خارج از محدوده 3 ± 37 و به طور همزمان عدم مشاهده پیام FAM در نمونه	شرایط PCR با آنچه در کیت آمده است همخوانی ندارد	مشابه آنچه در قبل آمده است.
	واکنش PCR مهار/ ممانعت شده است.	۱- اطمینان حاصل کنید که از روش استخراج مناسبی استفاده کرده اید و دقیقاً مشابه آنچه که در روش کار آمده است عمل کرده اید. ۲- اگر از روش هایی با بافرهای شستشوی حاوی اتانول استفاده می کنید، اطمینان حاصل کنید که در طول فرآیند استخراج کلیه مراحل سانتریفوژ کردن را جهت زدودن اتانول باقی مانده انجام داده اید.
	دنا (DNA) در فرآیند استخراج از دست رفته است.	اطمینان حاصل کنید که از روش استخراج مناسبی با کارایی بیش از ۷۰٪ استفاده کرده اید و دقیقاً مشابه آنچه که در روش کار آمده است عمل کرده اید.
	شرایط نگهداری یک یا تعداد بیشتری از اجزای کیت مطابق آنچه که در کیت آمده نبوده و یا این که تاریخ استفاده از کیت به اتمام رسیده است.	مشابه آنچه در قبل آمده است.



نشانه (Symptom)	علت احتمالی	راه حل
مشاهده پیام FAM در نمونه های کنترل منفی (استخراج و PCR)	در خلال آماده سازی مواد برای PCR، آلودگی رخ داده است.	۱- PCR را با استفاده از مواد تازه تکرار کنید. ۲- اگر امکان پذیر است، بلافاصله پس از اضافه کردن نمونه ها درب تیوب ها را ببندید. ۳- کنترل های مثبت را با دقت و آخر از همه نمونه ها آماده کنید. ۴- اطمینان حاصل کنید که محل کار و دستگاه در فواصل زمانی مشخص آلودگی زدایی شوند.
در خلال فرآیند استخراج آلودگی رخ داده است.	۱- یک نمونه پلاسمای منفی (غیر از آنچه داخل کیت است) را استخراج کنید تا آلوده بودن یا نبودن کیت استخراج را کنترل کنید. ۲- در صورت آلوده نبودن کیت، مجدداً استخراج نمونه ها را با دقت بیشتری انجام دهید (به عنوان کنترل منفی از پلاسمای منفی جدید استفاده کنید). ۳- در صورت آلوده بودن کیت، کیت جدیدی تهیه کرده و استخراج نمونه های مورد آزمایش را با کیت جدید انجام دهید. ۴- اطمینان حاصل کنید که محل کار و دستگاه در فواصل زمانی مشخص آلودگی زدایی شوند.	۱- یک نمونه پلاسمای منفی (غیر از آنچه داخل کیت است) را استخراج کنید تا آلوده بودن یا نبودن کیت استخراج را کنترل کنید. ۲- در صورت آلوده نبودن کیت، مجدداً استخراج نمونه ها را با دقت بیشتری انجام دهید (به عنوان کنترل منفی از پلاسمای منفی جدید استفاده کنید). ۳- در صورت آلوده بودن کیت، کیت جدیدی تهیه کرده و استخراج نمونه های مورد آزمایش را با کیت جدید انجام دهید. ۴- اطمینان حاصل کنید که محل کار و دستگاه در فواصل زمانی مشخص آلودگی زدایی شوند.
شرایط نگهداری یک یا تعداد بیشتری از اجزای کیت مطابق آنچه که در کیت آمده نبوده و یا این که تاریخ استفاده از کیت به اتمام رسیده است.	مشابه آنچه در قبل آمده است.	مشابه آنچه در قبل آمده است.
شرایط PCR یا آنچه در کیت آمده است همخوانی ندارد.	مشابه آنچه در قبل آمده است.	مشابه آنچه در قبل آمده است.
دستگاه Real-time PCR کالیبره نیست کالیبره نبودن بخش نوری دستگاه: این امر از طریق تأثیر در شدت فلورسانس شناسایی شده (به ویژه در غلظت های پائین) و اثر آن بر استاندارد شماره ۵ می تواند باعث ایجاد کارایی پائین شده و هم اینکه در مورد نمونه های با غلظت کم ممکن است موجب بروز منفی کاذب شود. کالیبره نبودن بخش دمایی (ترمال) دستگاه: این امر موجب ایجاد دماهایی غیر از آنچه برای واکنش بهینه است شده و باعث کاهش کارایی و نیز در مورد نمونه های با تعداد تیترا پائین ممکن است موجب بروز منفی کاذب شود.	کالیبره نبودن بخش نوری دستگاه: این امر از طریق تأثیر در شدت فلورسانس شناسایی شده (به ویژه در غلظت های پائین) و اثر آن بر استاندارد شماره ۵ می تواند باعث ایجاد کارایی پائین شده و هم اینکه در مورد نمونه های با غلظت کم ممکن است موجب بروز منفی کاذب شود. کالیبره نبودن بخش دمایی (ترمال) دستگاه: این امر موجب ایجاد دماهایی غیر از آنچه برای واکنش بهینه است شده و باعث کاهش کارایی و نیز در مورد نمونه های با تعداد تیترا پائین ممکن است موجب بروز منفی کاذب شود.	اطمینان حاصل کنید که دستگاه کالیبره است (معمولاً توصیه شرکت های سازنده کنترل و کالیبراسیون هر ۶ ماه یکبار یا حداکثر هر یک سال یکبار است)
کارایی بالا (بیشتر از ۱۰۵٪)	عمده ترین دلیل کارایی بالا (غیر معمول) کالیبره نبودن سمپلرها است.	از کالیبره بودن سمپلرها اطمینان حاصل کنید و در صورت نیاز برای کالیبراسیون اقدام کنید.



مراجع / استانداردهای مورد استفاده

- CLSI Standard EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods, Second edition
- ISO/IEC Guide 37:2012(en) Instructions for use of products by consumers.
- ISO 15223:2016 Medical devices — Symbols to be used with medical device labels, labelling and information to be supplied.



پش بانی فنی

- برای پشتیبانی فنی لطفاً با realtime@dyna-bio.com یا تلفن ۴۳۹۰۸۰۰۰ تماس بگیرید.
- اگر کیفیت هریک از خدمات/محصولات ما مطابق درخواست شما نبوده است لطفاً فرم "اعلام عدم رضایت/زکارکرد محصول" را در سایت شرکت بیابید، آن را تکمیل کرده و برای ما ارسال نمایید. شما می‌توانید با گرفتن شماره پیگیری مربوط، تا دریافت نتیجه نهایی، روند بررسی را پیگیری نمایید.

نشانی دفتر مرکزی

تهران، خیابان سهروردی شمالی، خیابان افشار جوان، پلاک ۱۸، طبقه اول.

نشانی واحد تو د

پارک فناوری پردیس، نوآوری ۴، پلاک ۴۳، واحدهای ۱۰۵ و ۱۰۶.



DynaBio™ is a registered trademark of Takapouzist Co.

DynaBio™ علامت تجاری ثبت شده متعلق به شرکت تکاپوزیست است.



یادداشت



تکاپو زیست
مراهمی مطمئن در
زیست مولکولی

تلفن: ۴۳۹۰۸۰۰۰

پشتیبانی فنی: realtime@dyna-bio.com