DynaBio™

ساخت ایران

راهنمای کاربری

کیت شناسایی و سنجش کمّی
ویروس هپاتیت ث در پلاسما به روش Real-Time PCR

DynaBio™ HCV Quantitative Real-Time PCR Kit

برای دستگاههای: Rotor-Gene Q/6000, Exicycler 96

ویرایش ۱/۴
فروردین ماه ۱۳۹۳

۵۰ آزمونه

شناسه: ک ر ۰۰۲۵

Cat # KR0025

For Research Use Only

فقط برای مصارف پژوهشی

تکاپو زیست

فهرست:

اطلاعات کلی

محتویات ۳

نگهداری ۳

اطلاعات ایمنی ۴

کنترل کیفیت ۴

نشانه ها ۴

معرفی کیت حاضر ۵

محدودیت های بکارگیری محصول ۵

مختصری درباره Real-Time PCR ۶

ویروس هپاتیت ث و بیماری زایی ۸

رابطهٔ تعداد نسخ ویروس و واحد بین المللی ۸

ویژگی های عملکردی

حساسیت تحلیلی ۹

ویژگی تحلیلی ۱۰

بازهٔ خطی ۱۱

دقت ۱۲

ارزیابی تشخیصی ۱۴

سایر مواد و وسایل مورد نیاز (که در کیت ارائه نشده) ۱۵

توصیه های عمومی ۱۵

جمع آوری، نگهداری و حمل و نقل نمونه ها ۱۶

نگهداری نمونه ۱۶

حمل و نقل نمونه ۱۷

مواد تداخل کننده ۱۷

معرفی اجزای کیت ۱۸

روش کار
استخراج رنای ویروسی (Viral RNA) ۲۰
انجام آزمون Real-time PCR
نکات عمومی ۲۱
آماده سازی مخلوط اصلی واکنش ۲۲
برنامهٔ واکنش PCR ۲۳
برنامه دهی به دستگاه Exicycler 96 ۲۴
برنامه دهی به دستگاه Rotor-Gene Q/6000 ۳۰

تحلیل داده ها ۳۷
تنظیمات نرم افزاری ۳۷
تفسیر و گزارش نتایج ۴۲
روندنمای تفسیر نتایج و گزارش نهایی ۴۳
تعیین تیتر ویروس بر حسب IU در هر میلی لیتر پلاسما ۴۴

حل مشکل ۴۵
پشتیبانی فنی ۴۷

اطلاعات کلی

محتویات

ردیف	رنگ/ جنس برچسب	عناوین و محتویات	تعداد ویال در هر کیت ۵۰ تایی	حجم در هر ویال (میکرولیتر)
۱	آبی/ شفاف	مخلوط۱ (تک مرحله ای) Mix1 (One-Step)	۱	۱۲۵۰
۲	آبی/ کاغذی	مخلوط۲ Mix2	۱	۳۰۰
۳	قرمز تیره/ شفاف	استاندارد۱ ۱×۱۰^{۴} IU/µl	۱	۲۰۰
۴	قرمز روشن/ شفاف	استاندارد۲ ۱×۱۰^{۳}IU/µl	۱	۲۰۰
۵	صورتی تیره/ شفاف	استاندارد۳ ۱×۱۰^{۲}IU/µl	۱	۲۰۰
۶	صورتی روشن/ شفاف	استاندارد۴ ۱×۱۰^{۱}IU/µl	۱	۲۰۰
۷	سبز/ شفاف	کنترل داخلی IPC	۱	۵۰۰
۸	زرد/ شفاف	کنترل منفی NTC	۱	۱۲۵۰

نگهداری

کیت می بایست در دمای ۲۰°C- نگهداری شود. برای اطلاع از شمارهٔ سری ساخت[1] و تاریخ انقضای کیت به برچسب روی جعبه کیت رجوع شود. برای جلوگیری از کاهش حساسیت آزمون، از ذوب و انجماد[2] مکرر مواد (بیش از ۵ بار) خودداری گردد.

[1] Lot#
[2] Freeze & thawing

اطلاعات ایمنی

برای آگاهی از اطلاعات ایمنی کیت، لطفاً *برگهٔ داده های ایمنی*[1] مربوط را در وب سایت شرکت بیابید.

کنترل کیفیت

هر سری ساخت "*کیت شناسایی و سنجش کمّی ویروس هپاتیت ث 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

[1] MSDS: Material Safety Data Sheets

معرفی کیت حاضر

این کیت برای شناسایی و سنجش کمّی ویروس هپاتیت ث (در پلاسما) با استفاده از فناوری Real-time PCR (روش TaqMan) طراحی و اعتبارسنجی[1] شده است. شناسایی/ سنجش کمّی از طریق تکثیر یک ناحیهٔ ۱۱۰ جفت بازی کاملاً حفظ شده[2] از ژنوم ویروس و با استفاده از پروب اختصاصی مربوطه (دارای رنگ فلوئورسانس 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 فلوئورسانس 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 بکارگیری محصول

- کلیهٔ مواد می بایستی فقط و فقط برای کاربردهای in vitro استفاده شوند.
- کاربری این محصول تنها توسط کاربری که برای انجام آزمایش‌های in vitro مولکولی در آزمایشگاه تشخیصی آموزش های لازم را دیده است صورت پذیرد.
- برای گرفتن نتایج PCR بهینه، عملکرد دقیق مطابق راهنمای کاربری ضروری است.
- می بایستی به تاریخ انقضای نوشته 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 فلوؤرسان و استفاده از ابزاری برای پایش تغییرات فلوؤرسانس این مواد، امکان بررسی واکنش در زمان انجام واکنش و نیز انجام محاسبات بعدی فراهم می آید.

از جمله برتری های Real-time PCR نسبت به PCR معمولی می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. حساسیت بالاتر
۲. امکان کمّی سازی
۳. حذف مراحل بعد از PCR[1] (الکتروفورز محصول PCR، رنگ آمیزی و مشاهدهٔ ژل روی دستگاه نوردهی فرابنفش[2]) و در نتیجه:
   - استفاده نکردن از رنگ های سمّی و سرطان زا مانند اتیدیوم بروماید
   - به حداقل رساندن آلودگی ناشی از محصول PCR (عدم گشودن در تیوب ها 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 تقسیم بندی کلی شاید بتوان آنها را به دو دستهٔ عمده طبقه بندی کرد:

۱. روش های غیر اختصاصی[3]

در این نوع روش ها از رنگ های فلوؤرسانی استفاده می شود که به صورت غیر اختصاصی (مستقل از توالی) به هر DNAی دو رشته ای متصل می شوند (همانند SYBR Green). از آنجا که پیام[4]/ پاسخ دریافتی می تواند مربوط به هر DNAی دو رشته ای باشد، در این روش برای اطمینان از صحت پیام (سیگنال) مشاهده شده می توان از بررسی های تکمیلی (منحنی ذوب DNA و . . .) بهره جست.

[1] Post PCR
[2] UV Transilluminator
[3] Non Specific Methods
[4] Signal

۲. روش های اختصاصی[1]

در این نوع روش‌ها از توالی‌های الیگونوکلئوتیدی اختصاصی یا همان پروب ها (مکمل قسمتی از توالی هدف مورد جستجو با PCR) استفاده می‌شود که با رنگ های فلوؤرسان نشاندار شده‌اند. انواع متعددی از پروب ها با طراحی ها و ویژگی های مختلف وجود دارند ولی ویژگی مشترک تمامی آنها ایجاد تغییرات در فلوؤرسانس، درپی/ 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) می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. بررسی وجود یا عدم وجود ژن های خاص (تومور مارکرها، . . .)
۲. شناسایی و سنجش کمّی عوامل بیماری زا
۳. تعیین ژنوتایپ عوامل بیماری زا
۴. پایش درمان های دارویی
۵. بررسی بیان ژن ها
۶. تشخیص های پیش از تولد
۷. پایش MRD [2]
۸. و . . .

[1] Specific Methods
[2] Minimal Residual Disease

ویروس هپاتیت ث و بیماری زایی

ویروس هپاتیت ث یک RNA ویروس پوشش دار[1] متعلق به خانوادهٔ فلاوی ویریده[2] است. بیش از ۳٪ جمعیت دنیا به این ویروس آلوده بوده و تخمین زده می شود که حدود ۳۰٪ آنها دچار فاز انتهایی بیماری کبدی[3] می شوند. شناسایی و سنجش کمّی این ویروس در پلاسما نقش مهمی در تشخیص و پایش عفونت هپاتیت ث و نیز پاسخ دارویی آن ایفا می کند.

رابطهٔ تعداد نسخ ویروس و واحد بین المللی(IU) [4]

به خاطر عدم دقت روشهای کنونی تعیین تعداد نسخ ویروس و یا اسیدهای نوکلئیک مربوط، سازمان بهداشت جهانی[5] اقدام به تهیه و توزیع استانداردهای تیتر ویروسی[6] مربوط به برخی از عناوین ویروسی همانند هپاتیت ث نموده است.

غلظت استانداردهای به کار رفته در این کیت با استفاده از چهارمین استاندارد بین المللی سازمان بهداشت و سلامت جهانی[7] عیار (کالیبره) شده اند و نتایج این کیت بر حسب واحد بین المللی در واحد حجم (IU/µl یا IU/ml) گزارش می شود.

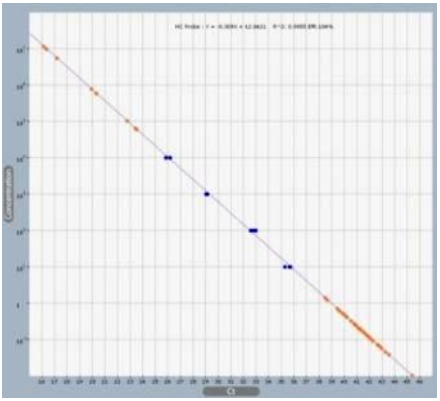
در خصوص رابطهٔ بین تعداد نسخ و واحد بین المللی، اعداد گوناگونی (بین ۲ تا ۱۰ نسخه از ویروس هپاتیت ث به ازای هر واحد بین المللی) ذکر شده است که این اعداد نه قابل اعتماد و نه مفید هستند.

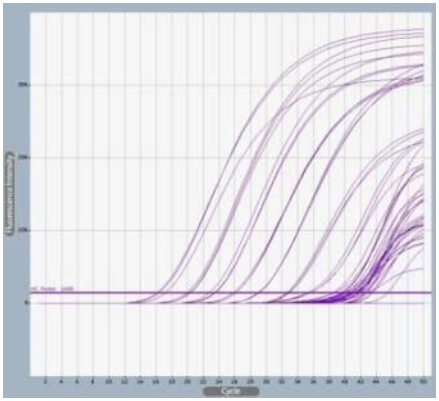
[1] Enveloped RNA Virus
[2] Flaviviridae
[3] End-stage Liver Disease
[4] IU: International Unit
[5] WHO: World Health Organization
[6] Viral Loads
[7] WHO International Standard 4th Hepatitis C Virus (HCV) RNA International Standard, code: 06/102.

ویژگی های عملکردی

حساسیت تحلیلی[1]

حد تشخیص تحلیلی *"کیت شناسایی و سنجش کمّی ویروس هپاتیت ث در پلاسما"* مستقل از حساسیت روش استخراج به کار رفته تعیین شده است. برای تعیین حساسیت تحلیلی "کیت شناسایی و سنجش کمّی ویروس هپاتیت ث در پلاسما"، یک سری رقت متوالی از غلظت اسمی ۱ تا ۰/۰۱IU/µl از رنایHCV آماده و با استفاده از این کیت ارزیابی شدند. استفاده از ۱۰ تکرار از هر نمونه و انجام آزمون منجر به تعیین حساسیت تا ۰/۵ IU/µl گردید (با pValue معادل ۰/۰۵). این بدان معنی است که به احتمال بیش از ٪ ۹۵، مقادیر ۰/۵ IU/µl قابل شناسایی خواهند بود.





[1] Analytical Sensitivity

ویژگی تحلیلی[1]

ویژگی (اختصاصیت) تحلیلی *"کیت شناسایی و سنجش کمّی ویروس هپاتیت ث در پلاسما"* ساخت شرکت تکاپوزیست در مرحلهٔ اول با انتخاب و طراحی مناسب پرایمرها، پروب ها و شرایط دقیق واکنش، تضمین شده است.

در مرحلهٔ بعد، توانایی شناسایی ژنوتیپ های مختلف ویروس هپاتیت ث (ژنوتیپ های ۱ تا ۶) با استفاده از پانل ژنوتیپ های ویروس هپاتیت ث[2] مورد بررسی و تأئید قرار گرفت.

شناسایی با کیت حاضر	نام نمونه/ ژنوتیپ
+	۱a
+	۱b[3]
+	۲
+	۳
+	۴
+	۵
+	۶

[1] Analytical Specificity

[2] Non WHO Reference Material HCV RNA Genotype Panel for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC)

[۳] این ژنوتیپ جزو پانل WHO نبوده و یک نمونه بیمار تأئید شده است.

همچنین، آزمون از نظر واکنش متقاطع[1] با منابع ذکر شده در جدول زیر مورد بررسی قرار گرفت که با هیچ یک از آنها واکنش متقاطعی دیده نشد.

مشخصات	نتایج
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
2nd WHO International Standard for HBV for Nucleic Acid Amplification (NAT) Assay	منفی
و دنای (DNA) ژنومی انسان	منفی

بازهٔ خطی[2]

بازهٔ خطی (سنجش تحلیلی) *"کیت شناسایی و سنجش کمّی ویروس هپاتیت ث در پلاسما"* با تجزیه و تحلیل یکسری از رقت های استاندارد رنای HCV در بازهٔ ۱×۱۰^{۷} IU/µl تا ۰/۰۱ تعیین شد. نتیجه نشان می دهد که بازهٔ خطی این کیت، از غلظت حداقل ۱IU/µl تا ۱×۱۰^{۷} IU/µl را تحت پوشش قرار می دهد.

[1] Cross Reactivity
[2] Linear range

دقت[1]

داده های دقت *"کیت شناسایی و سنجش کمّی ویروس هپاتیت ث در پلاسما"* امکان تعیین وردایی[2] کلی آزمون را فراهم می آورد. وردایی کل محاسبه شده متشکل است از :

۱. وردش درون آزمونی[3] (تغییرپذیری/ متغیر بودن نتایج چندین نمونهٔ مشابه با غلظت‌های یکسان در یک آزمایش)

۲. وردش بین آزمونی[4] (تغییرپذیری/ متغیر بودن نتایج آزمون هایی که توسط کاربران مختلف با دستگاه های مختلف از یک نوع و در یک آزمایشگاه، حاصل شده است).

داده های دقت *"کیت شناسایی و سنجش کمّی ویروس هپاتیت ث در پلاسما"* با استفاده از دو نمونه از استانداردهای کمّیت سنجی (استاندارد۱: ۱۰۰۰۰ IU/µl و استاندارد۴: ۱۰ IU/µl) جمع آوری شدند. آزمون در ۵ روز مختلف توسط کاربران متفاوت و با استفاده از ۱۰ تکرار روی هر نمونه و با استفاده از یک دستگاه ثابت انجام شد. داده های به دست آمده برای تعیین انحراف معیار[5]، واریانس و ضریب وردش[6] واکنش PCR اختصاصی پاتوژن استفاده شدند. داده های دقت بر مبنای مقادیر چرخهٔ آستانه[7] (C_t) محاسبه شدند. همچنین از روی این مقادیر، داده های نتایج کمّی بر حسب IU/µl نیز محاسبه گردید.

نام آزمون	انحراف معیار بر حسب Ct	وردایی (واریانس) بر حسب Ct	CV برحسب Ct	انحراف معیار برحسب IU	وردایی (واریانس) برحسب IU	CV برحسب 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: داده های دقت برای استاندارد شمارهٔ ۱ (دستگاه Exicycler96)

[1] Precision
[2] Variance
[3] Intra assay variation
[4] Inter assay variation
[5] SD: Standard Deviation
[6] CV: Coefficient of Variation
[7] C_t : Cycle of threshold

نام آزمون	انحراف معیار بر حسب Ct	وردایی (واریانس) بر حسب Ct	CV برحسب Ct	انحراف معیار برحسب IU	وردایی (واریانس) برحسب IU	CV برحسب IU
وردش درون آزمونی Intra Assay variation	۰/۱۶	۰/۰۲۵	۰/۴۳ ٪	۱/۵۵	۲/۴۲	۱۱/۷۶ ٪
وردش بین آزمونی Inter Assay variation	۰/۲۹	۰/۰۹	۰/۷۷ ٪	۲/۰۷	۴/۴۹	۱۹/۸۱ ٪
وردایی کل Total variance	۰/۳۴	۰/۱۲	۰/۹ ٪	۲/۶۳	۶/۹۲	۲۴/۴۵ ٪

جدول ۲: داده های دقت برای استاندارد شمارهٔ ۴ (دستگاه Exicycler96)

نام آزمون	انحراف معیار بر حسب Ct	وردایی (واریانس) بر حسب Ct	CV برحسب Ct	انحراف معیار برحسب IU	وردایی(واریانس) برحسبIU	CV برحسب IU
وردش درون آزمونی Intra Assay variation	۰/۱۲	۰/۰۱۵	۰/۴۶ ٪	۸۰۰/۳۴	۶۴۰۵۴۶	۸/۶۳ ٪
وردش بین آزمونی Inter Assay variation	۰/۲۸	۰/۰۹	۱/۰۵ ٪	۲۰۲۴/۷۸	۴۶۴۱۰۷۹	۲۰/۷ ٪
وردایی کل Total variance	۰/۳۲	۰/۱	۱/۲ ٪	۲۲۹۸/۱۷	۵۲۸۱۶۲۵	۲۳/۶۹ ٪

جدول ۳: داده های دقت برای استاندارد شمارهٔ ۱ (دستگاه Rotor Gene Q)

نام آزمون	انحراف معیار بر حسب Ct	وردایی (واریانس) بر حسب Ct	CV برحسب Ct	انحراف معیار برحسب IU	وردایی(واریانس) برحسب IU	CV برحسب IU
وردش درون آزمونی Intra Assay variation	۰/۳۲	۰/۱	۰/۸۷ ٪	۱/۴۳	۲/۰۵	۲۲/۰۶ ٪
وردش بین آزمونی Inter Assay variation	۰/۳۸	۰/۱۵	۱/۰۴ ٪	۲/۵۳	۶/۹۱	۲۷/۳۳ ٪
وردایی کل Total variance	۰/۵۰	۰/۲۵	۱/۳۶ ٪	۲/۹۹	۸/۹۶	۳۲/۹۰ ٪

جدول ۴: داده های دقت برای استاندارد شمارهٔ ۴ (دستگاه Rotor Gene Q)

ارزیابی تشخیصی[1]

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

حساسیت بالینی (کلینیکی)[2]**:**

برای این منظور ۵۰ نمونه HCV مثبت تأئید شده مورد آزمایش قرار گرفتند.

کلیه نمونه ها با استفاده از *"کیت شناسایی و سنجش کمّی ویروس هپاتیت ث در پلاسما"* مثبت تشخیص داده شدند.

ویژگی (اختصاصیت) بالینی[3]**:**

برای این منظور ۱۰۰ پلاسمای منفی تأئید شده مورد آزمایش قرار گرفتند.

کلیهٔ نمونه ها با استفاده از *"کیت شناسایی و سنجش کمّی ویروس هپاتیت ث در پلاسما"* منفی تشخیص داده شدند.

[1] Diagnostic Evaluation
[2] Clinical Sensitivity
[3] Clinical Specificity

سایر مواد و وسایل مورد نیاز (که در کیت ارائه نشده)

- دستکش های آزمایشگاهی (لاتکس/ مصنوعی) یکبار مصرف **بدون پودر.**
- کیت استخراج رنای ویروسی (Viral RNA) (دستی یا مخصوص دستگاه استخراج خودکار)
- سمپلر (متغیر)
- سر سمپلر های فیلتردار استریل عاری از نوکلئازها[1]
- لرزانک (ورتکس[2])
- چرخانک (اسپین[3])
- میکروفیوژ با دور ۱۴۰۰۰ rpm
- نوار[4] یا میکروتیوب های مخصوص Real-time PCR متناسب با دستگاه
- دستگاه Real-time PCR
- هود PCR
- گرمخانه (آون) یا صفحهٔ گرم شونده (Heating-Block)

توصیه های عمومی

- از سر سمپلر های استریل فیلتر دار استفاده نمایید.
- همواره قبل و بعد از انجام آزمون سطح زیر هود/ میز را با پنبهٔ آغشته به الکل ٪۷۰ کاملاً تمیز کرده، سپس به مدت ۵ دقیقه با پرتوی فرابنفش پرتودهی کنید.
- برای آلودگی زدایی مواد زاید شامل سرسمپلرها، تیوب ها، استریپ های حاوی محصول PCR و . . .، آنها را پس از مصرف به مدت ۱ ساعت در آب ژاول (وایتکس) ٪۱۰ غوطه ور کنید.

[1] DNase RNase Free
[2] Vortex
[3] Spin
[4] Strip

- نمونه های مثبت (اعم از پلاسما، کنترل ها و محصول واکنش زنجیره ای پلی مراز[1]) را به دور از مواد دیگر، استخراج و نگهداری نموده، در فضای جداگانه ای آن ها را به مخلوط واکنش اضافه نمایید.
- پیش از انجام واکنش دقت نمایید که همهٔ اجزا در دمای اتاق کاملاً ذوب شده باشند.
- هنگامی که اجزای کیت ذوب شد، آنها را ۱۰ ثانیه با لرزانک (ورتکس) مخلوط کنید و سپس با استفاده از چرخانک (اسپین) از تجمع محتویات لوله ها در انتهای آنها (پائین آمدن مواد از دیواره ها) مطمئن شوید.

جمع آوری، نگهداری و حمل و نقل نمونه

اعتبارسنجی این کیت با استفاده از نمونه های پلاسمای ا.د.ت.آ[2] دار (بین ۱/۵ تا ۲ میلی گرم نمک پتاسیم EDTA به ازای هر میلی لیتر از خون) انجام شده است. نمونه های دیگر اعتبار سنجی نشده اند.

⚠ پلاسمای ا.د.ت.آ دار یا سیتراته[3] به عنوان بهترین نمونه برای تشخیص ویروس هپاتیت ث توصیه شده است.

نگهداری نمونه

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

[1] Polymerase Chain Reaction (PCR)
[2] E.D.T.A
[3] Citrated

حمل و نقل نمونه ها

به عنوان یک اصل کلی همهٔ نمونه ها می بایست بالقوه بیماری زا تلقی شوند. نمونه ها باید در محفظه ای مقاوم جابجا شوند تا از خطر انتشار آلودگی پیش گیری شود. نمونه ها می بایست مطابق دستورالعمل‌های محلی و ملی برای حمل مواد بیماری‌زا جابجا شوند.

در صورتیکه خون گیری در محلی غیر از محل نگهداری نمونه/ آزمایشگاه انجام شد، نمونه ها باید ظرف مدت ۶ ساعت به مقصد برسند. نمونه های خون می بایست در شرایط خنک (۲°C+ تا ۸°C+) و نمونه های پلاسما به صورت منجمد (۲۰°C-) حمل شوند.

مواد تداخل کننده

مقادیر بالای بیلی روبین (≥۱۵ mg/dl) و لیپید ها (≥ ۸۰۰mg/dl) و نمونه های همولیز شده واکنش را تحت تاثیر قرار نمی دهند ولی هپارین (≥۱۰IU/ml) موجب مهار/ حذف/ کاهش کارآیی واکنش زنجیره ای پلی مراز می شود. نمونه هایی که در میکروتیوب های حاوی هپارین به عنوان مادهٔ ضد انعقاد جمع آوری شده اند، نباید مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، نمونهٔ بیمارانی که هپارین دریافت کرده اند نیز نباید مورد استفاده قرار گیرند.

معرفی اجزای کیت

در این کیت اجزای زیر وجود دارند:

- **مخلوط ۱ (تک مرحله ای) (Mix1)**

این مخلوط حاوی مواد لازم برای ساخت cDNA و به دنبال آن انجام واکنش PCR بوده و شامل آنزیم‌های نسخه بردار معکوس، DNA پلی مراز، dNTP ها و بافر مربوط است.

- **مخلوط ۲ (Mix2)**

این مخلوط حاوی پرایمرها و پروب های لازم برای شناسایی و تکثیر رنای ویروس و کنترل داخلی اضافه شده به نمونه هاست.

- **استانداردهای سنجش کمّی شماره ۱ تا ۴**

این استانداردها که از جنس RNA مقاوم در برابر نوکلئازها هستند (با میزان مشخص تیتر ویروس بر حسب IU) امکان ترسیم یک نمودار استاندارد را فراهم می آورد. معادلهٔ حاکم بر این نمودار استاندارد برای انجام کلیهٔ محاسبات سنجش کمّی و تعیین تیتر ویروس در نمونهٔ استخراج شده مورد استفاده قرار می گیرد. همچنین این نمودار کارآیی[1] واکنش PCR انجام شده و نیز ضریب رگرسیون نقاط استاندارد (R^2) را تعیین می کند. در یک واکنش PCR موفق باید شرایط زیر حاکم باشد:

$$R\hat{}2 > ۰/۹ \quad \text{و} \quad ۱۰۵٪ > \mathbf{e_{PCR}} > ۹۰٪$$

- **کنترل داخلی (IPC)** [2]

کنترل داخلی تعبیه شده در این کیت، یک قطعه رنای خارجی مقاوم در برابر نوکلئازهای پلاسما است که به هر نمونه ای که قرار است رنای آن استخراج شود افزوده می شود. در صورت کارآیی مناسب کیت استخراج مورد استفاده، انجام صحیح فرآیند استخراج، ساخت cDNA با کارآیی مناسب و عدم وجود بازدارنده های احتمالی PCR، این رنای خارجی در واکنش PCR تکثیر شده و با استفاده از پروب اختصاصی مربوطه شناسایی می شود. در این حالت چرخهٔ آستانه (C_t)

[1] Efficiency (e_{PCR})
[2] Internal Positive Control

کنترل داخلی در نمونهٔ پلاسمای منفی که تحت فرآیند استخراج قرار گرفته می‌بایست ۳±۳۷ باشد. این میزان پراکندگی به جهت تفاوت در تجهیزات و فرآیند خالص سازی ایجاد می شود. انحراف بیش از این دلالت بر بروز مشکل در فرآیند خالص سازی دارد. در این موارد فرآیند استخراج می‌بایست کنترل و در صورت لزوم کل آزمون از مرحله استخراج تا آزمون Real-time دوباره تکرار شود.

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

- **کنترل منفی (N.T.C)**[1]

کنترل منفی، نمونهٔ پلاسمایی است که از نظر وجود رنای HCV 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 نمونهٔ منفی و عدم وجود سیگنال HCV (FAM) می‌تواند به عنوان مبنایی جهت تأئید موارد زیر مورد استفاده قرار گیرد:

۱. صحت فرآیند استخراج رنا
۲. صحت و کارآیی مناسب مرحله ساخت cDNA
۳. مهیا بودن شرایط برای واکنش PCR (عدم وجود بازدارنده ها در رنای استخراج شده و ...)

چرخهٔ آستانه (C_t)کنترل داخلی در این نمونه می‌بایست ۳±۳۷ باشد.

[1] No Template Control

روش کار

استخراج رنای ویروسی (Viral RNA)

کیت های استخراج رنا توسط سازندگان بسیاری ارائه می‌گردد. میزان نمونهٔ مورد نیاز برای فرآیند استخراج رنا بسته به روش کار، متفاوت است. لطفاً فرآیند استخراج رنا را مطابق دستورالعمل تولید کننده به انجام رسانید.

توصیه می شود از دستگاه های خودکار استخراج اسیدهای نوکلئیک استفاده کنید. این امر می تواند موجب افزایش حساسیت و کاهش/ حذف احتمال آلودگی از یک نمونه به نمونهٔ دیگر[1] شود. لازم به ذکر است که اعتبارسنجی این کیت با استفاده از روش استخراجی با کارآیی بیش از ٪۷۰ صورت گرفته است. در زیر به برخی کیت های استخراج مناسب که می توانند کارآیی بیش از ٪۷۰ داشته باشند، اشاره شده است:

نام کیت	شناسه (Cat#)	سازنده
کیت استخراج اسیدهای نوکلئیک ویروسی از سرم و پلاسما ***DynaBio*** Viral Nucleic Acide Extraction Mini Kit	ک ج ۰۰۲۵	تکاپوزیست
QIAamp Viral RNA Mini Kit	52904	Qiagen

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 RNA را در ۵۰ میکرولیتر بافر جمع آوری می کنید، در ابتدا می بایست ۵ میکرولیتر کنترل داخلی اضافه شود.

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

⚠ برای افزایش کارآیی استخراج و جلوگیری از رقیق شدن محصول نهایی استخراج که در برخی موارد ممکن است موجب ایجاد نتایج منفی کاذب (به ویژه در نمونه های با تیتر ویروسی پائین) شود، در مرحله آخر استخراج حداکثر از ۵۰ میکرولیتر بافر رهاسازی (Elution Buffer) استفاده کنید.

کنترل داخلی طراحی شده در این کیت از نوع رقابتی است بنابراین از چندگانه[2] 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 تأثیرگذار بر حساسیت آزمون (در محدودهٔ بازهٔ خطی آن) نمی شود.

[1] Cross Contamination
[2] Multiplex

پیام کنترل داخلی فقط در نمونه های منفی یا نمونه هایی با تیتر پائین ویروس مشاهده می شود. در نمونه هایی با تیتر بالای ویروس، پیام (سیگنال) کنترل داخلی مشاهده نشده و یا به طور ضعیفی مشاهده می شود.

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 برنامه ریزی دستگاه تان را انجام داده، دستگاه را آماده به کار کنید سپس اقدام به خروج مواد از فریزر و آماده سازی آنها برای انجام آزمون نمائید.
۳. از کالیبره بودن سمپلرهایتان اطمینان حاصل کنید.
۴. قبل از انجام آزمون از ذوب شدن کامل موادی که از فریزر بیرون آورده اید 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، نمونه ریزی[1]، چسبیدن مواد به دیواره ها و . . .) در حین انجام کار مواجه نشوید.
۶. برای مخلوط کردن مواد از پیپتاژ و لرزان کردن (ورتکس) و برای پائین آوردن مواد از دیواره ها از چرخان کردن (اسپین) استفاده کنید.
۷. برای ترسیم منحنی استانداردی دقیق و جلوگیری از برآورد نادرست[2] مقادیر، استفاده از هر ۴ نمونه استاندارد توصیه می شود. برای اطمینان بیشتر نسبت به نتایج آزمون می توان نمونه ها/ استانداردها را به صورت دوتایی[3] مورد استفاده قرار داد.

[1] Sampling
[2] Under or Over estimation
[3] Duplicate

آماده سازی مخلوط اصلی واکنش

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

نام	حجم به میکرولیتر
مخلوط ۱ (تک مرحله ای)	۲۵
مخلوط ۲	۵

مخلوط اصلی واکنش (مخلوط ۱+ مخلوط ۲) را برای تعداد کل نمونه ها به اضافه ٪۵ اضافی در یک تیوب ۲ میلی لیتری استریل (عاری از نوکلئازها) آماده کنید.

حداقل تعداد کل نمونه ها در یک دور واکنش[1] عبارت است از:

نام	تعداد
استانداردهای سنجش کمّی	۴
کنترل منفی استخراج شده	۱
آب تزریقی (کنترل منفی PCR)	۱
کنترل مثبت (در صورت استفاده)	-
نمونه های مجهول (بیمار) استخراج شده	x
جمع کل	x+۶

در هر تیوب مخصوص Real-time PCR، ۳۰ میکرولیتر از مخلوط آماده شده و ۲۰ میکرولیتر از رنای نمونهٔ مورد آزمایش/ استانداردها/ کنترل منفی ها اضافه کرده، ابتدا به آرامی پیپتاژ کرده، سپس در تیوب/ استریپ ها را بسته یا با برچسب مخصوص کاملاً پوشانده و محکم کنید. تیوب/ استریپ ها را چرخان کنید و در مکان مربوطه در دستگاه قرار دهید. دقت کنید تا هر نمونه در جایگاه تعریف شدهٔ خود قرار بگیرد.

[1] Run

برنامهٔ واکنش PCR

برای کار با دستگاه Exicycler96

تکرار	زمان	دما (درجهٔ سانتیگراد)
۱ چرخه	۳۰ دقیقه	۵۰
۱ چرخه	۵ دقیقه	۹۵
۵۵ چرخه	۱۵ثانیه	۹۵
	۵۰ ثانیه	۵۸
	-	خوانش (Scan) فلوؤرسانس نمونه ها • FAM برای HCV • JOE برای کنترل داخلی
	۲۰ ثانیه	۷۲

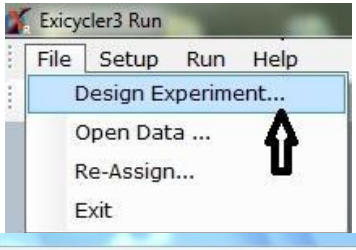
برای کار با دستگاه های RotorGene Q و RotorGene 6000

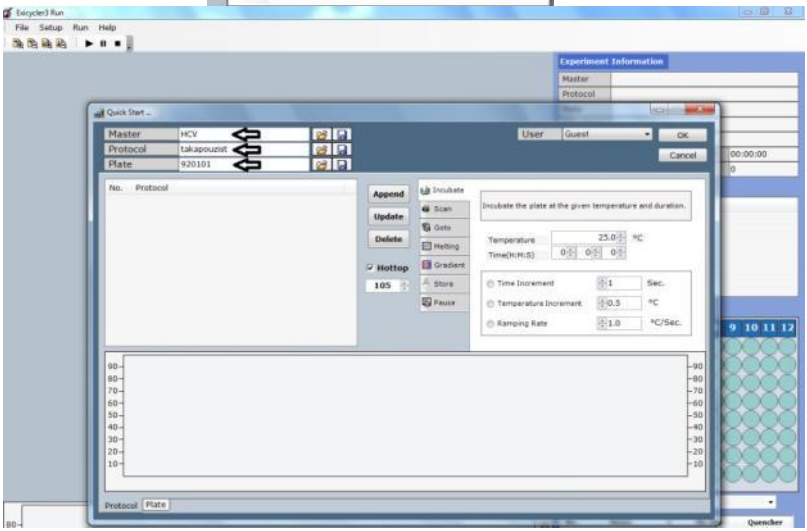
تکرار	زمان	دما (درجهٔ سانتیگراد)
۱ چرخه	۳۰ دقیقه	۵۰
۱ چرخه	۵ دقیقه	۹۵
۵۵ چرخه	۱۵ثانیه	۹۷
	۵۰ ثانیه	۵۸
	-	خوانش (Scan) فلوؤرسانس نمونه ها • FAM برای HCV • JOE برای کنترل داخلی
	۲۰ ثانیه	۷۲

برنامه دهی به دستگاه ExiCycler96

نرم افزار Exicycler Run را اجرا کنید.

وارد منوی File شده و بر روی ...Design Experiment کلیک کنید تا پنجرهٔ شکل زیر گشوده شود.





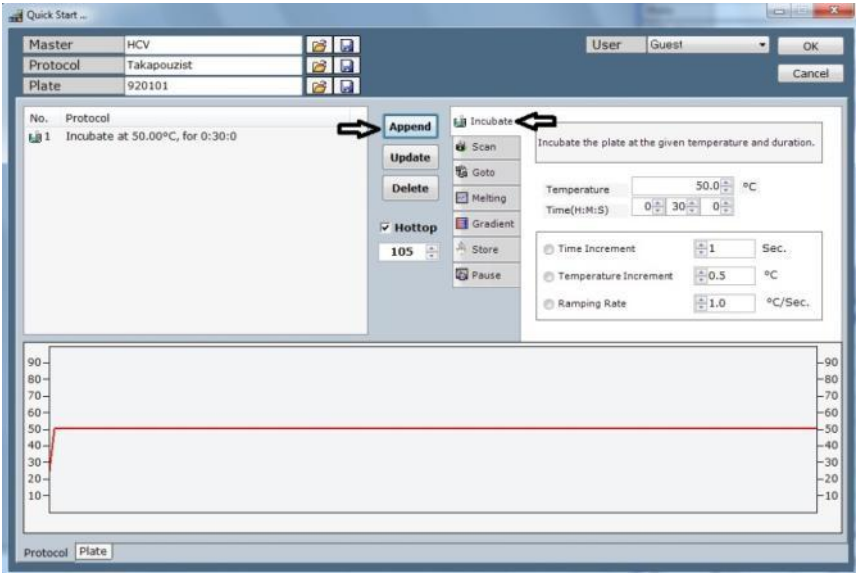
با توجه به شکل، به صورت زیر عمل کنید:

۱. در جعبه های موجود در کنار عبارات زیر، به ترتیب اسامی دلخواه را وارد کنید (کلیهٔ اسامی داده شده پیشنهادی اند):

a. Master → HCV
b. Protocol → Takapouzist
c. Plate → 920101 (تاریخ انجام واکنش بدون نشانه هایی مانند "/ ,")

۲. بر روی لبهٔ Incubate کلیک کرده و با توجه به برنامهٔ دمایی آزمون، مشخصات مربوط را یک به یک وارد سازید و در پایان هر مرحله دکمهٔ Append را بزنید (کلیهٔ دماها/ زمان ها/ . . . در زیر آورده شده است).

Temperature: 50 → Time: 30 min → Append
Temperature: 95 → Time: 5 min → Append
Temperature: 95 → Time: 15 sec → Append
Temperature: 58 → Time: 50 Sec → Append



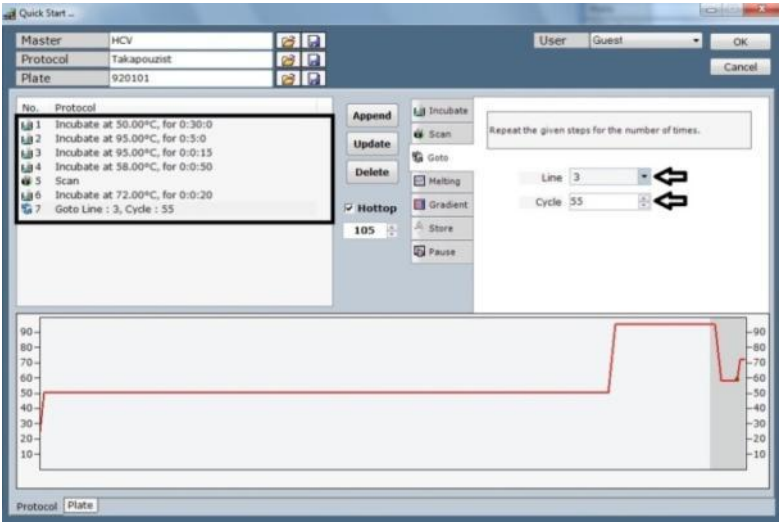
۳. بر روی لبهٔ Scan کلیک کرده و سپس دکمهٔ Append را بزنید.

۴. مجدداً بر روی لبهٔ Incubate رفته و برنامهٔ دمایی زیر را وارد کنید:

Temperature: 72 → Time: 20 Sec → Append

۵. بر روی لبهٔ Go to کلیک کرده و مشخصات زیر را وارد سازید :

a. Line=3
b. Cycle=55

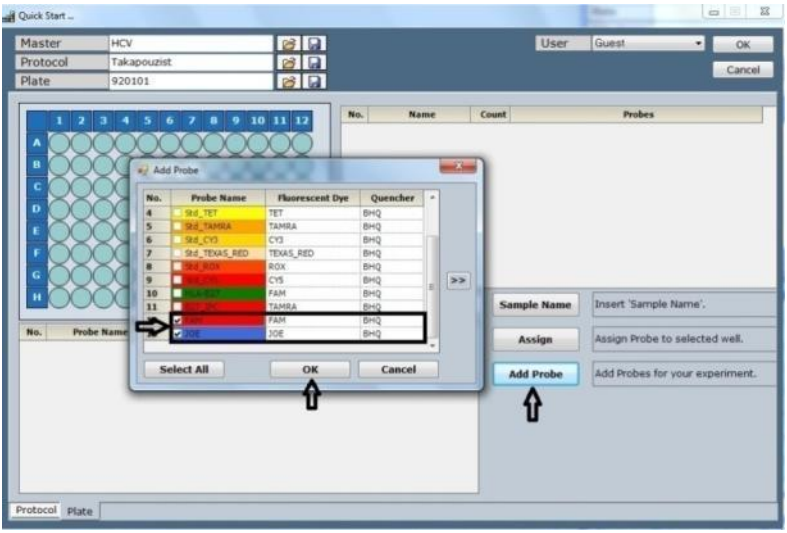


و در پایان دکمه Append را بزنید.

برای طراحی پلیت روی لبهٔ Plate کلیک نمایید و سپس به صورت زیر عمل کنید.

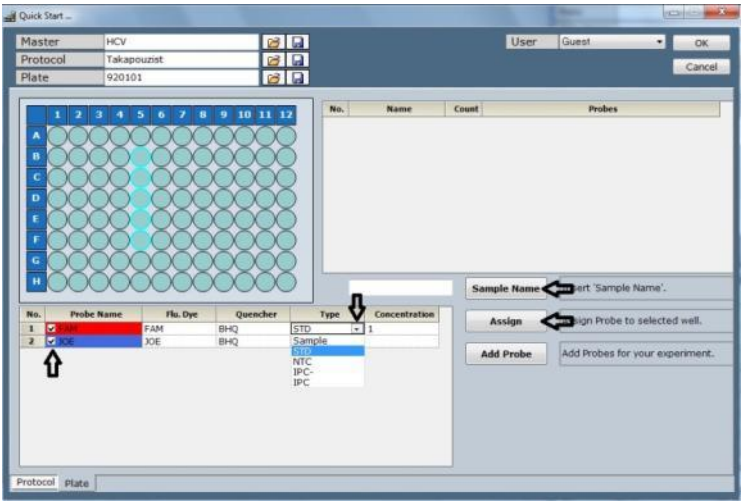
۱. روی لبهٔ Add Probe کلیک کنید تا پنجرهٔ زیر ظاهر شود:

۲. خانه های کنار پروب های مورد استفاده در آزمون (FAM BHQ وJOE BHQ) را تیک زده و سپس بر روی OK، کلیک نمایید.



۳. به تعداد تیوب هایی که می خواهید در دستگاه قرار دهید چاهک انتخاب کنید. برای اینکار همانند شکل زیر مثلاً روی خانهٔ B5 کلیک چپ کنید و در حالی که هم چنان کلیک چپ را می فشارید تا خانهٔ E5 حرکت کنید. در نتیجه خانه های B5 تا E5 پر نور می شوند.

- در قسمت Probe Name خانهٔ کنار پروب های انتخابی را تیک بزنید.
- روی گزینهٔ Assign کلیک کنید.



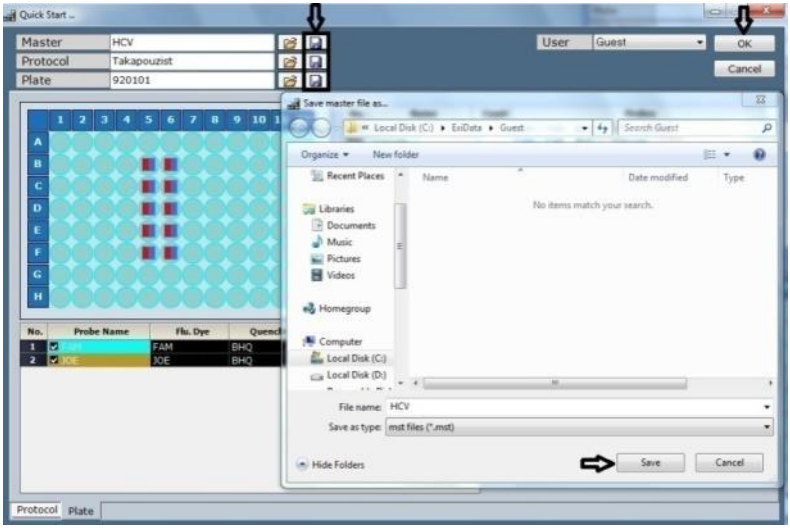
۴. سپس روی هر خانه کلیک کنید و با توجه به ماهیت آن (نمونه، استاندارد، کنترل منفی یا . . .)

- از منوی Type گزینهٔ مناسب را انتخاب کنید.
- در قسمت Sample Name، نام نمونه را وارد کنید.
- برای نمونه های استاندارد غلظت های مربوط به استانداردهای تعبیه شده در کیت (رجوع شود به صفحهٔ ۳) را وارد کنید.
- ابتدا روی گزینهٔ Sample Name و سپس روی گزینهٔ Assign کلیک کنید.

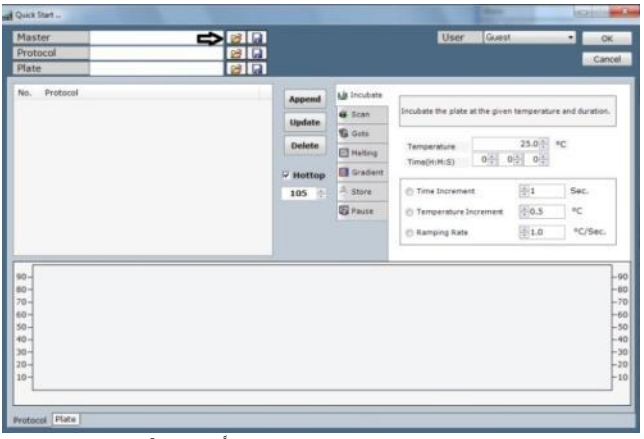
۵. این کار را در مورد تمام نمونه ها انجام دهید به طوری که در نهایت پس از انتخاب همهٔ خانه ها اطلاعات کامل و صحیح مربوطه به آنها در جدول سمت راست مطابق شکل صفحهٔ بعد ظاهر شود.

۶. در نهایت همانند شکل زیر به ترتیب بر روی نمای ذخیره در مجاورت هر یک از جعبه هایMaster ، Protocol و Plate کلیک کنید و در هر بار پس از ظاهر شدن پنجرهٔ save as روی گزینهٔ Save کلیک کنید تا تنظیمات وارد شده ذخیره گردند.

۷. پس از انجام مراحل ذکر شده در بالا همانند شکل زیر، دکمه OK را بفشارید تا از این پنجره خارج شوید و سپس برنامه Exicycler3 Run را ببندید.



۸. از این پس و برای انجام آزمون های بعدی با همین کیت، شما می توانید برای دستیابی به پروتوکل مربوطه و اجرای آن، پس از کلیک کردن بر روی گزینهٔ Design Experiment در برنامه Run Exicycler مطابق شکل زیر روی نمای بازکردن (open) در مجاورت جعبهٔ Master کلیک کرده و فایل مربوط را باز نمایید.

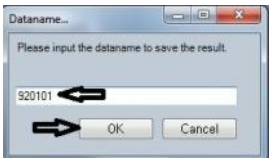


دقت کنید که به ازای هر چینش جدید پلیت، باید پلیت را مجدداً طراحی و آن را ذخیره نمایید.

۹. پلیت را در جای صحیح خود (مطابق آنچه که در تعریف پلیت طراحی کرده‌اید) در دستگاه قرار دهید. دکمهٔ Door دستگاه را برای چند ثانیه بفشارید تا در بسته شود.

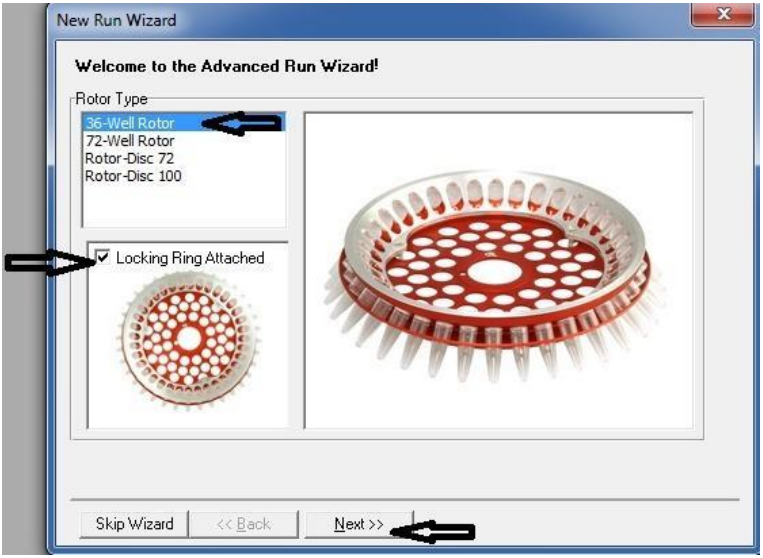
۱۰. بر روی دکمهٔ Run از پانل کلیک کنید.

۱۱. پس از آن پنجره ای باز می شود که نام فایلی که نتایج آزمون در آن ذخیره خواهد شد را از ما سوال می کند. می توانید تاریخ انجام آزمون یا هر اسم دلخواه دیگری را در آن وارد سازید. در هر صورت در نامگذاری فایل ها دقت کنید و از ذخیره سازی روی فایل های موجود خودداری کنید. با کلیک بر روی گزینه OK دستگاه شروع به کار خواهد کرد.

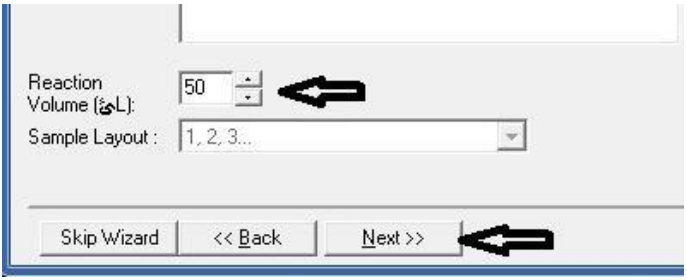


برنامه دهی به دستگاه RotorGene 6000 یا RotorGene Q

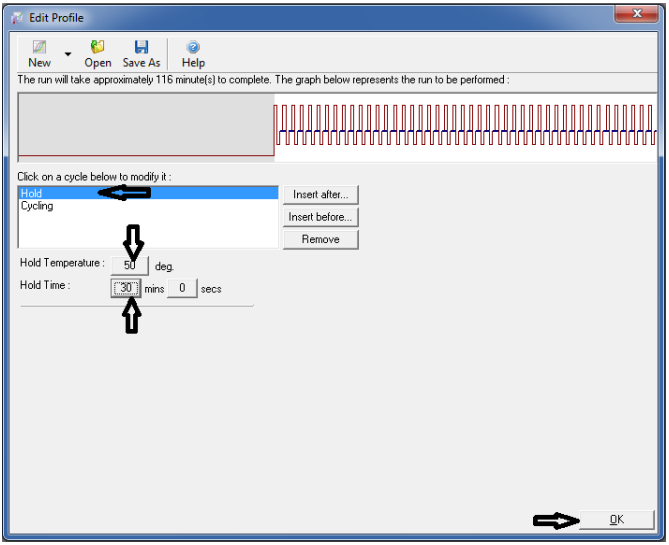
۱. نرم افزار دستگاه را اجرا کنید.
۲. روی گزینهٔ New کلیک کنید.
۳. در پنجرهٔ Quick Start مجدداً روی گزینهٔ New کلیک کنید.
۴. 36-Well Rotor را انتخاب کنید و گزینهٔ Locking Ring Attached را تیک زده روی گزینه Next کلیک کنید.



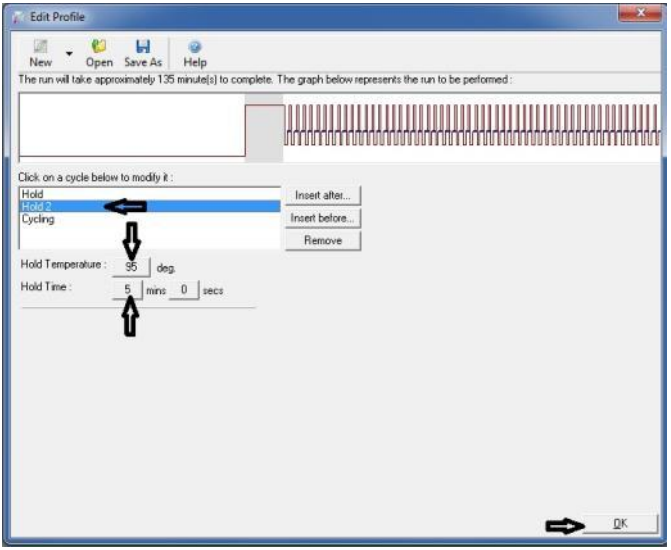
۵. حجم واکنش را روی ۵۰ میکرولیتر تنظیم کنید و روی گزینهٔ Next کلیک کنید.



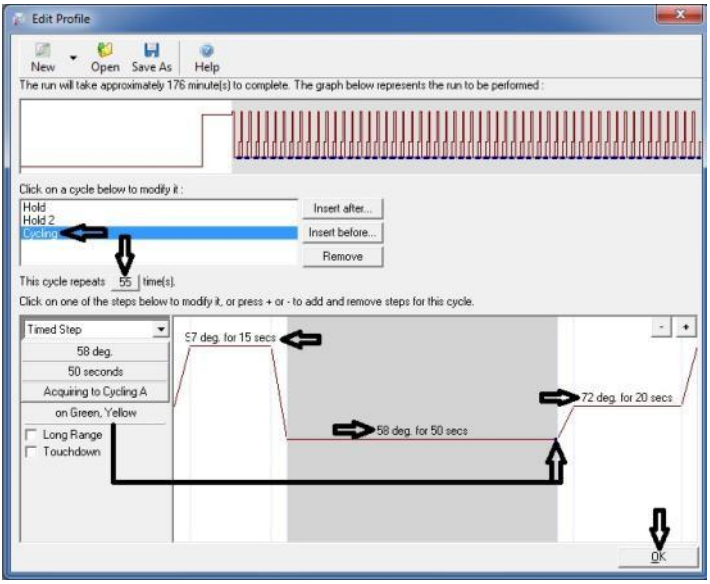
۶. مرحلهٔ ساخت cDNA را مطابق شکل صفحهٔ بعد با استفاده از Hold اولیهٔ خود نرم افزار در دمای $50^{o}C$ و به مدت ۳۰ دقیقه تعریف کنید.



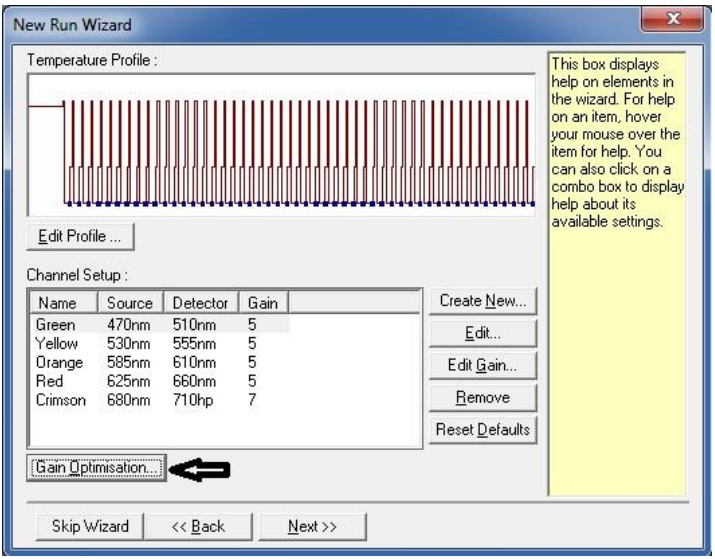
۷. سپس برای تعریف دمای واسرشت سازی اولیه در PCR، روی گزینهٔ Insert after کلیک کنید و از فهرست بازشده گزینهٔ New Hold at Temperature را انتخاب کنید تا بتوانید Hold2 با دمای ۹۵C^o و زمان ۵ دقیقه را مطابق شکل زیر تعریف کنید.



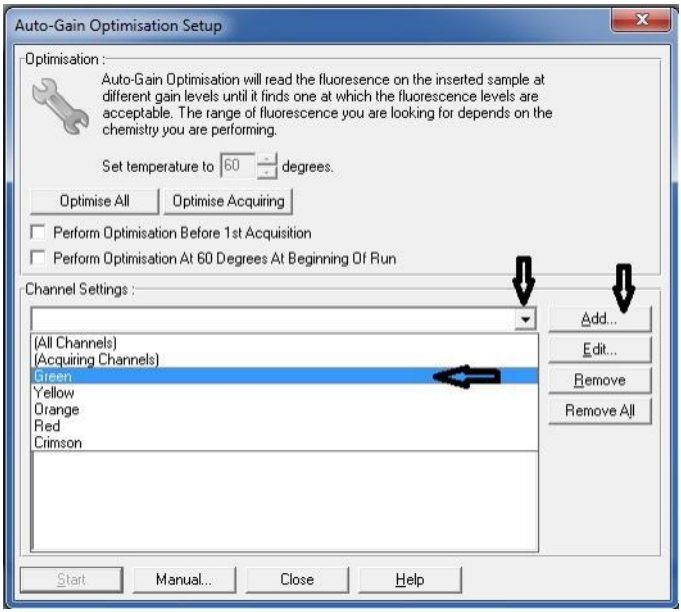
۸. سپس تنظیم برنامهٔ دمایی/ زمانی PCR را به همانند شکل زیر انجام دهید.



۹. روی OK کلیک کنید تا شکل زیر ظاهر شود. سپس روی Gain Optimisation کلیک کنید تا وارد صفحه Auto-Gain Optimisation Set Up شوید.

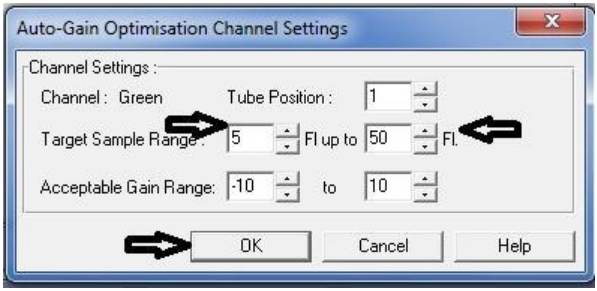


۱۰.در صفحه Auto-Gain Optimisation Set Up. از منوی بازشونده، Green را انتخاب کرده و سپس روی Add کلیک کنید.

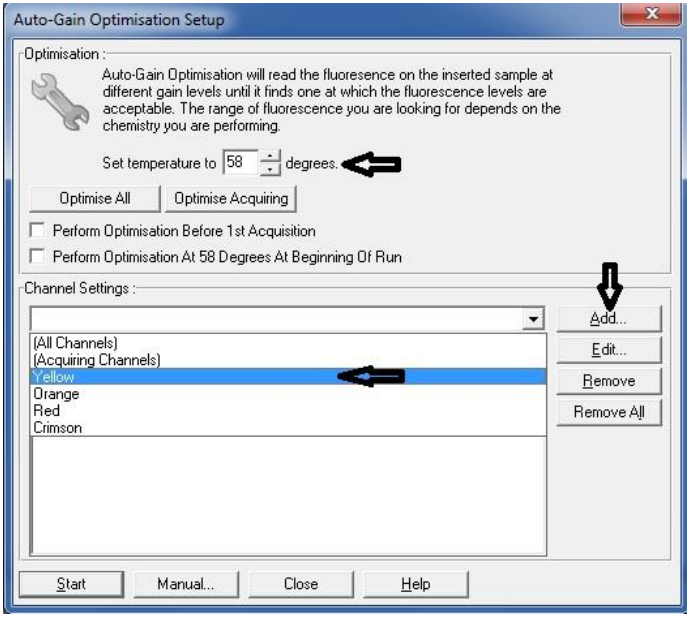


۱۱. پس از کلیک کردن روی Add، شکل زیر ظاهر می شود.

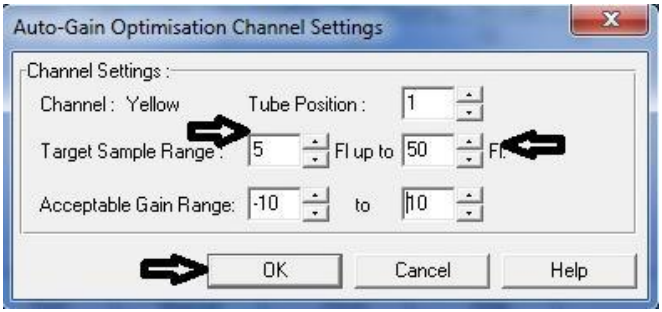
۱۲. در قسمت Target Sample Range حد پائین را روی ۵ و حد بالا را روی ۵۰ قرار دهید و سپس روی Ok کلیک کنید.



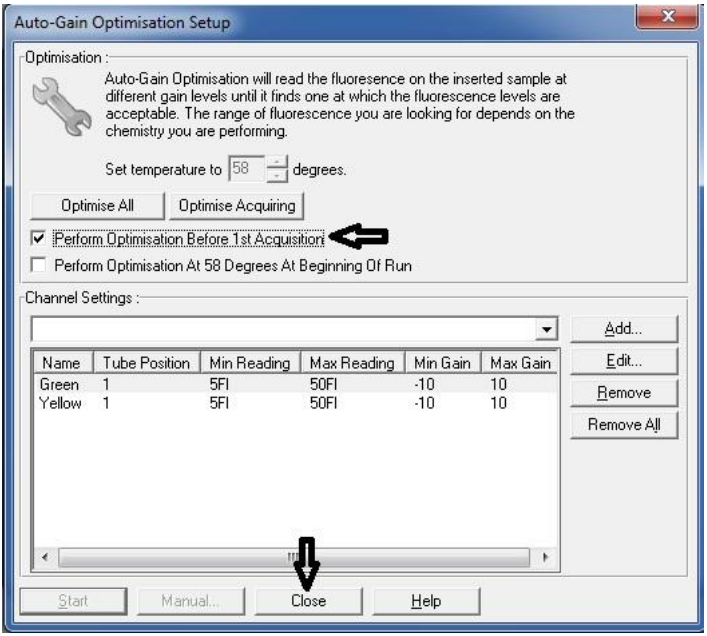
۱۳. پس از بازگشت به صفحه Auto-Gain Optimisation Set Up، دما را همانطور که در شکل زیر آمده، روی ۵۸ تنظیم کنید. مجدداً از منوی بازشونده، Yellow را انتخاب کرده و سپس روی Add کلیک کنید.



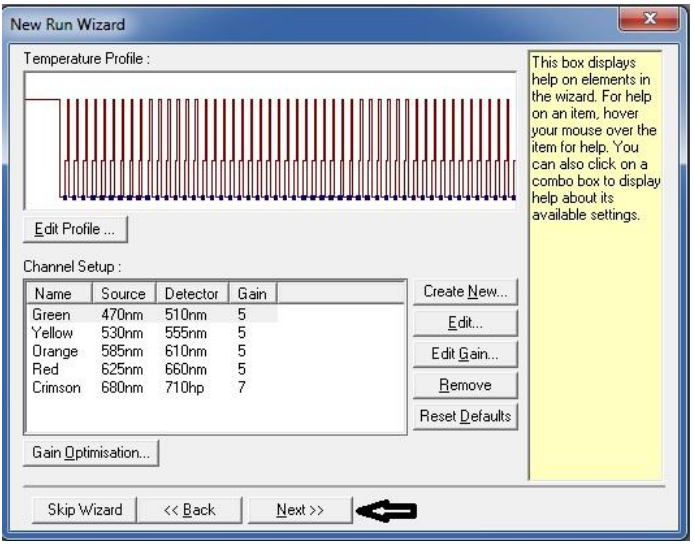
۱۴. همانند آنچه که برای کانال Green انجام دادید، در Target Sample Range حد پائین را روی ۵ و حد بالا را روی ۵۰ قرار دهید و سپس روی Ok کلیک کنید.



۱۵. همانند شکل زیر گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را تیک بزنید و روی Close کلیک کنید.



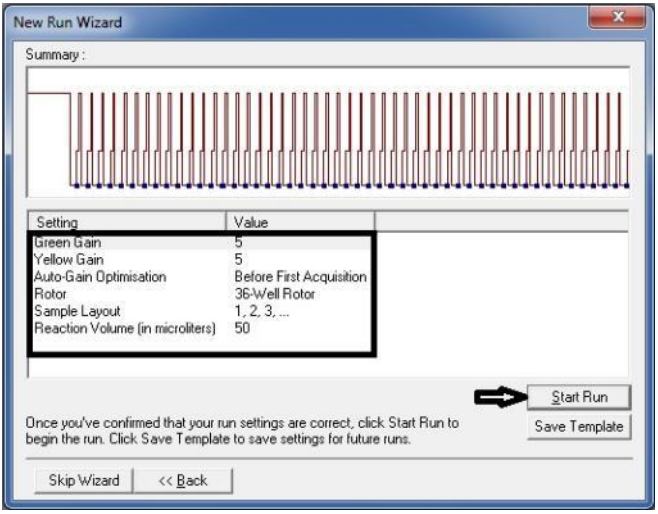
۱۶. همانند شکل زیر روی Next کلیک کنید.



۱۷. تیوب ها را در دستگاه قرار دهید (مشخصات و ترتیب چیدمان آنها را جایی یادداشت کنید).

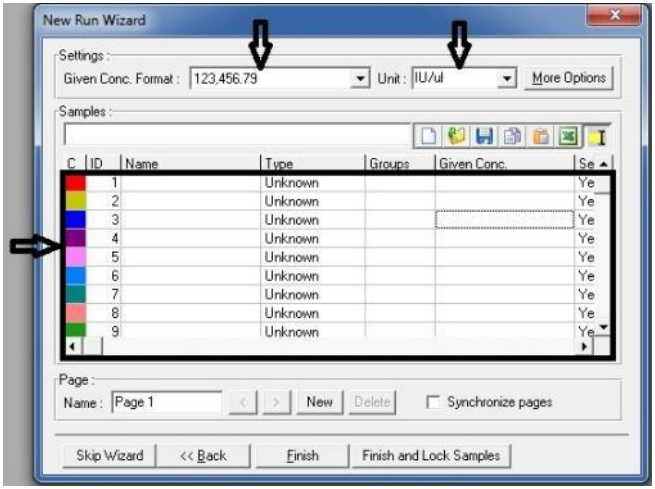
۱۸. حلقهٔ محافظ را کامل روی روتور محکم کرده و در دستگاه را ببندید.

۱۹. سپس روی گزینهٔ Start Run کلیک کنید.



۲۰. پس از ظاهر شدن پنجرهٔ نمونه‌ها، با توجه به ترتیب قرار داده شده در دستگاه، مشخصات هرکدام آنها را تعریف کنید.

⚠ در کار با دستگاه های RotorGene Q و RotorGene 6000 برای حالت نمایش غلظت ها، نوعی را انتخاب کنید که حتماً تا دو رقم اعشار بعد از ممیز را نشان می دهد. همچنین IU/µl را برای واحد غلظت انتخاب کنید.



تحلیل داده ها

تنظیمات نرم افزاری

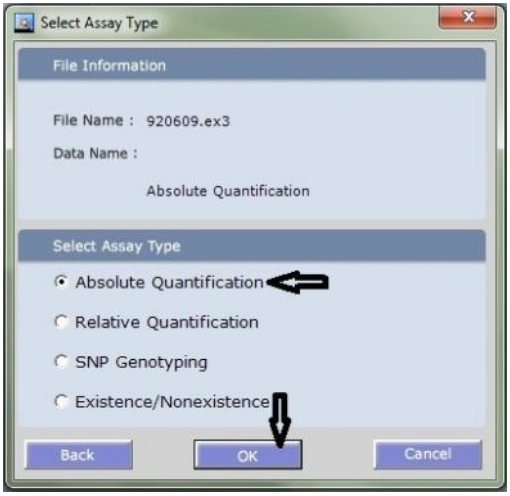
دستگاه Exicyler96

۱. پس از اتمام کار دستگاه، نرم افزار Exicycler Run را ببندید.

۲. نرم افزار Exicycler Analysis را اجرا کنید. همانند شکل زیر در منوی File روی گزینه Open کلیک کنید.

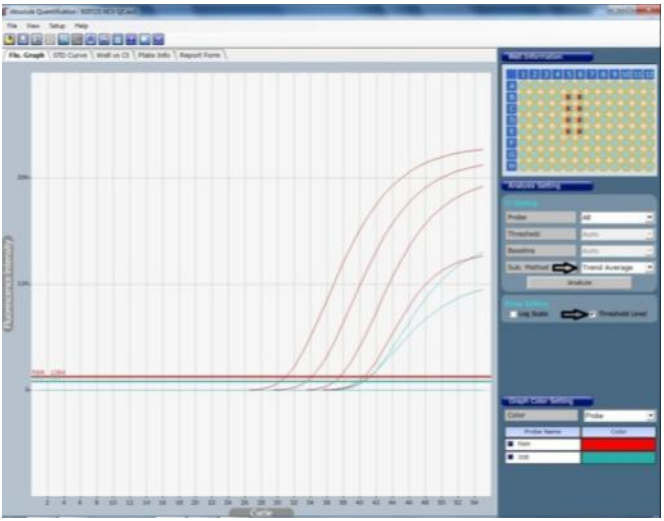
۳. فایل نتیجه مورد نظر (نامی که نتیجه را با آن ذخیره کرده اید) را انتخاب کرده و روی Open کلیک کنید.

۴. پنجره زیر ظاهر خواهد شد، دقت کنید که گزینه Absolute Quantification انتخاب شده باشد، در غیر اینصورت، آن را انتخاب کرده و سپس روی Ok کلیک کنید.

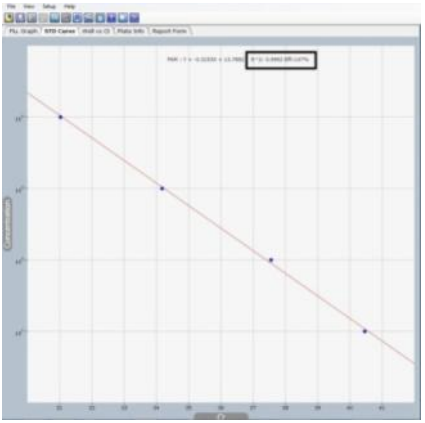


۵. پنجره زیر ظاهر خواهد شد. دقت کنید که Sub. Method در حالت Trend Average باشد و گزینه Threshold Level انتخاب شده باشد.

- با کلیک کردن روی لبهٔ Flu. Graph، امکان مشاهده نمودارها (هر دو کانال FAM و JOE) وجود دارد.

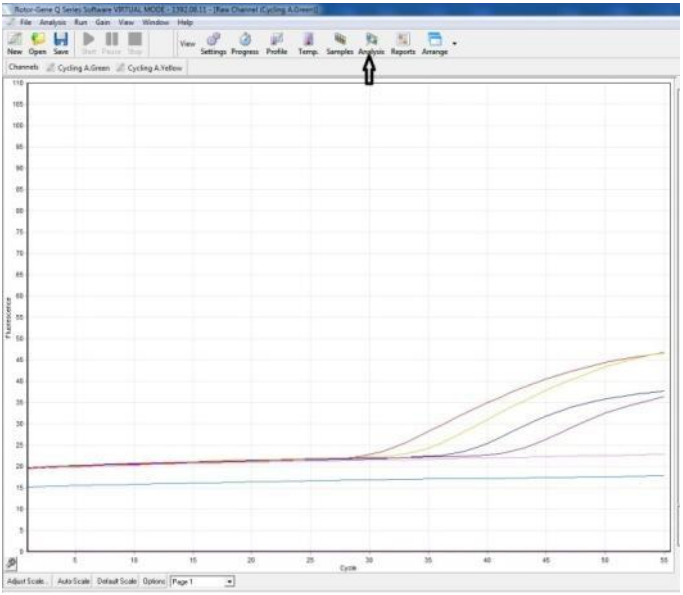


- با کلیک کردن روی لبهٔ STD Curve، امکان مشاهده نمودار استاندارد، کارآیی واکنش (Efficiency) و نیز R^2 وجود دارد.



- با کلیک کردن روی لبهٔ Report Form، امکان مشاهده Ct، تعداد نسخ محاسبه شده برای هر نمونه وجود دارد.

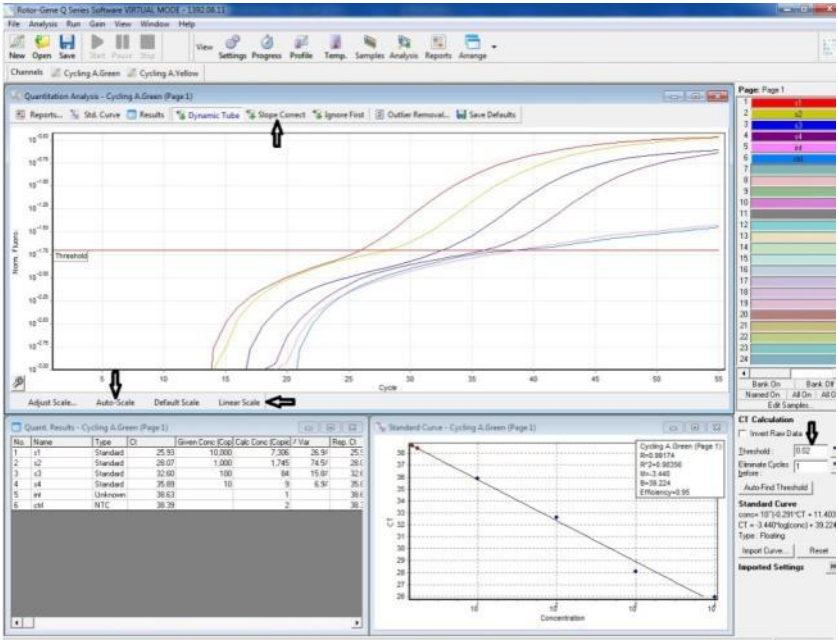
۱. پس از اتمام کار دستگاه و برای بررسی نتایج در هریک از کانال ها، همانند شکل زیر روی Analysis کلیک کنید.



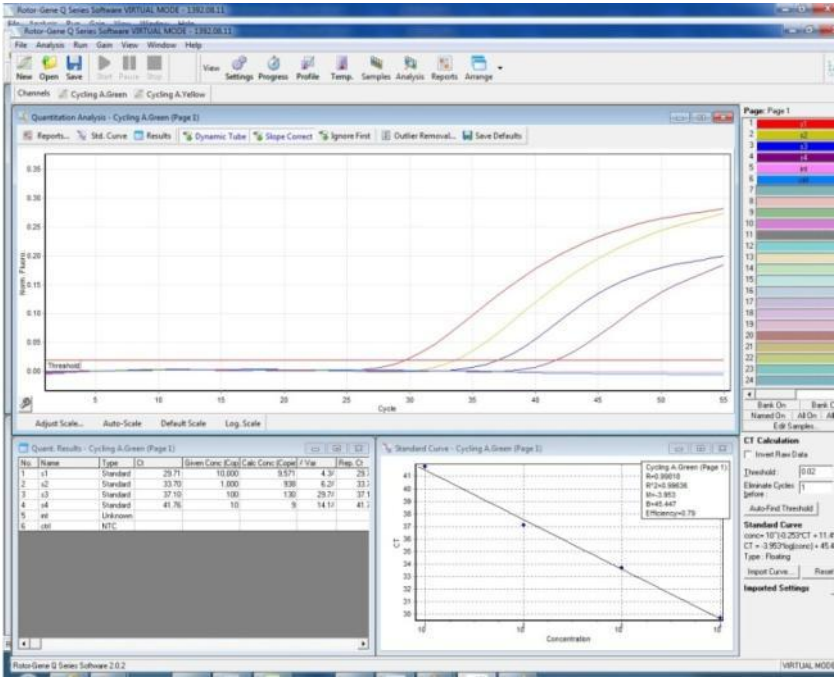
۲. سپس در پنجره Analysis همانند شکل زیر، کانال مورد نظر را انتخاب کرده و روی Show کلیک کنید.

۳. پس از ظاهر شدن پنجره زیر، ابتدا:

- 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.
- Threshold را بین ۰/۰۲ تا ۰/۰۴ قرار دهید.



۴. پس از انجام این کارها، شکلی همانند صفحه بعد خواهید داشت. با کلیک بر روی نماد مربع (Maximize) در هریک از پنجره های موجود در صفحه، امکان بزرگ کردن آن پنجره و دیدن آن به صورت تکی وجود دارد. با کلیک کردن مجدد بر روی همین نماد، مجدداً پنجره ها به صورت سه تایی نمایش داده خواهند شد.



۵. با بزرگ کردن پنجره Quantitation Analysis، امکان مشاهده نمودارها وجود دارد.

۶. با بزرگ کردن پنجره Standard Curve، امکان مشاهده نمودار استاندارد، کارآیی واکنش (Efficiency) و نیز R^2 وجود دارد.

۷. با بزرگ کردن پنجره Quant. Results امکان مشاهده Ct، تعداد نسخ محاسبه شده برای هر نمونه وجود دارد.

۸. برای مشاهده و تحلیل نتایج در کانال JOE (کنترل داخلی) نیز می بایستی همین روند طی شود.

تفسیر و گزارش نتایج

موارد زیر به عنوان نتایج آزمون محتمل است. روندنما[1]ی تفسیر نتایج و گزارش نهایی در صفحه بعد آمده است.

۱. پیام (سیگنال) FAM در نمونه شناسایی ولی در کنترل های منفی شناسایی نمی شود.

نتیجهٔ آزمون مثبت است: نمونه حاوی رنای (RNA) ویروس هپاتیت ث است.

در این حالت، ممکن است پیام JOE دیده نشود. زیرا غلظت های بالای رنای HCV می تواند منجر به کاهش یا حذف سیگنال کنترل داخلی گردد.

۲. پیام (سیگنال) FAM هم در نمونه و هم در کنترل های منفی شناسایی می شود.

احتمال نتیجهٔ مثبت کاذب وجود دارد: آزمون می بایست مجدداً تکرار شود (رجوع شود به قسمت حل مشکل)[2]

۳. پیام (سیگنال) FAM در نمونه شناسایی نمی شود ولی پیام JOE (مربوط به کنترل داخلی) در نمونه شناسایی می شود (C_t= ۳۷± ۳). در این حالت پیام کنترل داخلی احتمال وجود بازدارندهٔ PCR را رد می کند و بنابراین:

در نمونه، رنایHCV قابل شناسایی نیست و یا میزان آن پائین تر از حساسیت کلینیکی آزمون است. می توان با گزارش حساسیت آزمون به پزشک آن را منفی در نظر گرفت.

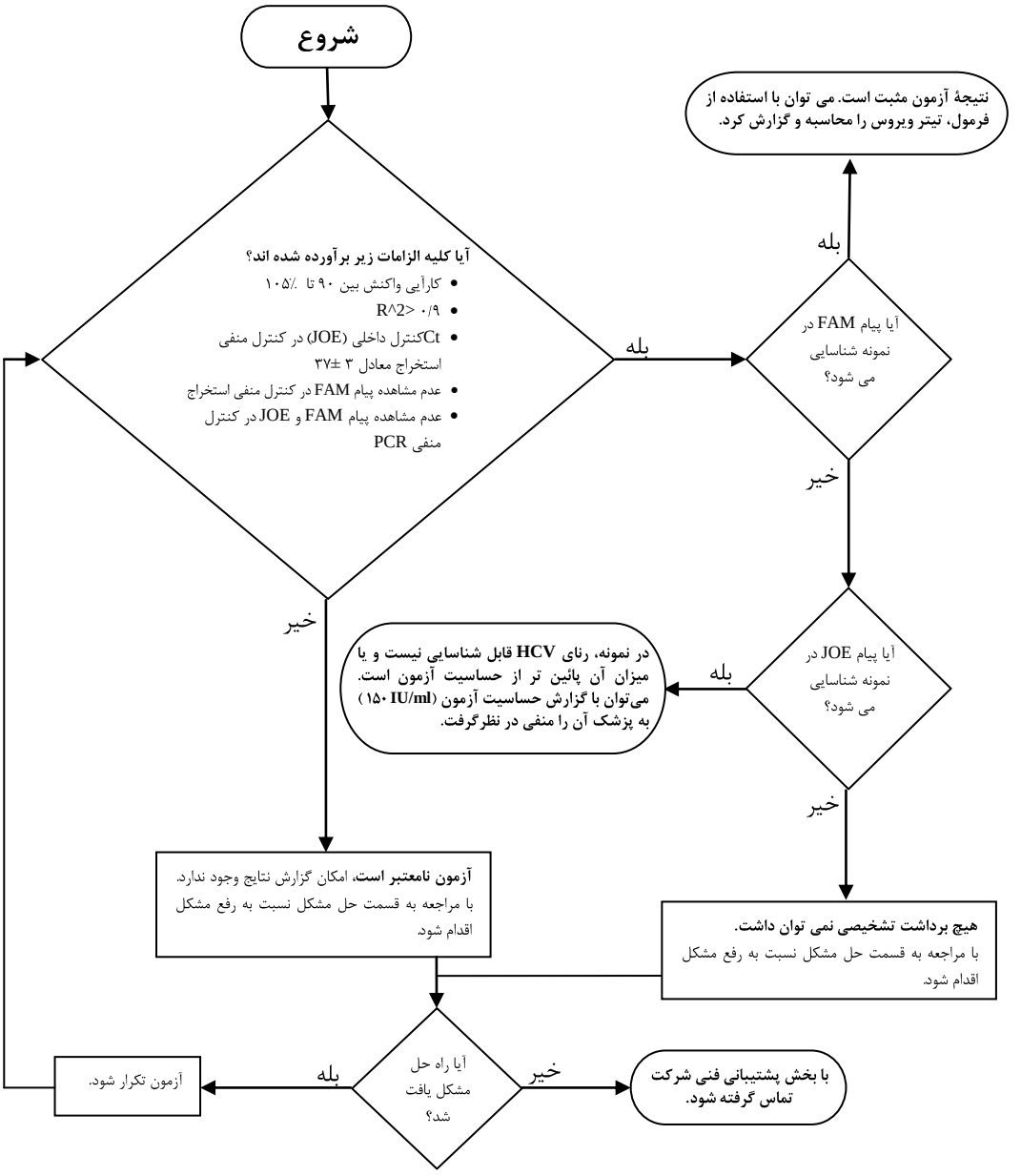
۴. نه پیام (سیگنال) FAM و نه پیام JOE در نمونه شناسایی نمی شوند.

هیچ برداشت تشخیصی نمی توان داشت.

اطلاعات مربوط به منشأ خطا و راه حل های آن را در قسمت **حل مشکل** می توان یافت.

[1] Flowchart
[2] Trouble Shooting

روندنمای تفسیر نتایج و گزارش نهایی



تعیین تیتر ویروس برحسب IU در هر میلی لیتر پلاسما

استاندارد های کمّیت سنجی این کیت با استفاده از چهارمین استاندارد بین المللی سازمان بهداشت و سلامت جهانی (WHO) کالیبره شده و بر حسب IU/µl هستند. برای تعیین IU ویروس در هر میلی لیتر از پلاسمای بیمار از معادلهٔ زیر استفاده کنید:

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

برای مثال اگر :

- حجم نمونهٔ سرم/ پلاسمای مورد استخراج: ۲۰۰ میکرولیتر
- حجم محصول نهایی استخراج شده: ۵۰ میکرولیتر
- و تیتر به دست آمده برای نمونه: IU/µl ۱۰۰ باشد

نتیجهٔ نهایی به صورت زیر محاسبه خواهد شد.

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

در نتیجه تیتر 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 تیتر وجود دارد و در غیر اینصورت می بایست آزمون مجدداً تکرار شود.

$$R^2 > ۰/۹ \text{ و } ۱۰۵٪ > \mathbf{e_{PCR}} > ۹۰٪$$

نکته: در برگهٔ گزارشی که برای پزشک آماده می کنید حتماً باید به محدودهٔ بازهٔ خطی، حساسیت تحلیلی آزمون و مشخصات کیت مورد استفاده اشاره شود.

لطفاً توجه داشته باشید که به عنوان یک اصل کلی، حجم اولیهٔ نمونهٔ مورد استخراج در معادلهٔ فوق لحاظ می‌گردد بنابراین هنگامی که حجم نمونهٔ مورد استفاده در فرآیند استخراج دچار تغییر می‌شود (مثلاً تغلیظ نمونه با سانتریفیوژ کردن و یا افزایش حجم با استفاده از بافر فسفات نمکی[1] برای رساندن آن به میزان مورد نیاز فرآیند استخراج) این تغییر می بایست در نظر گرفته شود.

[1] PBS

حل مشکل

نشانه (Symptom)	علت احتمالی	راه حل
عدم مشاهدهٔ پیام فلؤورسانس FAM در نمونه های استاندارد ۱ تا ۴	عدم انتخاب FAM در هنگام تعریف پروب PCR	به منظور تحلیل صحیح داده ها، می بایستی برای HCV 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 برنامهٔ PCR مرحلهٔ خوانش فلوؤرسانس 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 مشاهدهٔ پیام JOE کنترل داخلی در نمونه و یا کنترل منفی‌ای‌که در فرآیند استخراج واردشده است (Ct خارج از محدوده ۳ ±۳۷) و به طور همزمان عدم مشاهدهٔ 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 کلیهٔ مراحل سانتریفوژ کردن را جهت زدودن اتانول باقی مانده انجام داده اید.
	رنا (RNA) در فرآیند استخراج از دست رفته است.	اطمینان حاصل کنید که از روش استخراج مناسبی با کارآیی 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
مشاهدهٔ 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 در تیوب ها را ببندید. ۳- کنترل های مثبت را با دقت و آخر از همهٔ 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.
کارآیی پائین (کمتر از ٪۹۰)	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.
	شرایط PCR با آنچه در کیت آمده است همخوانی ندارد.	مشابه آنچه در قبل آمده است.
	دستگاه Real-time PCR کالیبره نیست **کالیبره نبودن بخش نوری دستگاه:** این امر از طریق تأثیر در شدت فلوؤرسانس شناسایی شده (به ویژه در غلظت های پائین) و اثر آن بر استاندارد شمارهٔ ۴ می تواند باعث ایجاد کارآیی 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 کارآیی و نیز در مورد نمونه های با تعداد تیتر پائین ممکن است موجب بروز منفی کاذب شود.	اطمینان حاصل کنید که دستگاه کالیبره است (معمولاً توصیه شرکت های سازندهٔ کنترل و کالیبراسیون هر ۶ ماه یکبار یا حداکثر هر یک سال یکبار است)
کارآیی بالا (بیشتر از ٪۱۰۵)	عمده ترین دلیل کارآیی بالا (غیر معمول) کالیبره نبودن سمپلرها است.	از کالیبره بودن سمپلرها اطمینان حاصل کنید و در صورت نیاز برای کالیبراسیون اقدام کنید.

پشتیبانی فنی

برای پشتیبانی فنی لطفاً با realtimePCR@dyna-bio.com یا تلفن های شرکت تماس بگیرید.

اگر کیفیت هر یک از خدمات/ محصولات ما مطابق درخواست شما نبوده است لطفاً "فرم اعلام عدم رضایت از کارکرد محصول" را در سایت شرکت بیابید. آن را تکمیل کرده و برای ما ارسال نمائید. شما می توانید با گرفتن شمارهٔ پیگیری مربوط، تا دریافت نتیجهٔ نهایی، روند بررسی را پیگیری نمائید.

یادداشت

تکاپو زیست

همراهی مطمئن در
زیست مولکولی

تلفن: ۸۸ ۸۶ ۴۱۰۱

پشتیبانی فنی: realtime@dyna-bio.com